



Università degli Studi di Pisa

DOTTORATO DI RICERCA IN CHIRURGIA, BIOTECNOLOGIE E IMMUNOLOGIA DEI TRAPIANTI

**“Ruolo del potenziale di membrana mitocondriale come sensore glucosio-specifico
nel Diabete Mellito”**

Candidata

Dott.ssa Serena Manzini

Tutor

Dott.ssa Elena Matteucci

Anno accademico 2011-2012

Sommario

RIASSUNTO	4
INTRODUZIONE	8
1.1 Epidemiologia e Incidenza	8
1.2 Il ruolo dello Stress Ossidativo	10
1.3 I Mitochondri	16
1.4 L'apoptosi	22
1.5 La Memoria metabolica	25
1.6 CITOFLUORIMETRIA A FLUSSO	28
1.6.1 Principi di base	28
1.6.2 Sostanze fluorescenti	33
2. SCOPO DELLA TESI	38
3. MATERIALI E METODI	39
3.1 Metodica di misurazione del $\Delta\Psi_m$ su cellule circolanti ex vivo	39
3.1.1 Produzione di Ros	40
3.2 Incubazione dei neutrofili in sangue intero	41
3.2.1. Incubazioni con glucosio e/o Insulina	41
3.3 Metodica di misurazione del $\Delta\Psi_m$ su culture cellulari	43
3.3.1 Fibroblasti	43
3.3.2 INS 1-E	44
3.3.3 HUVEC	45
3.3.3.1 Terreno di coltura	45
3.3.3.2 Trattamento delle fiasche e delle piastre per la cultura delle HUVEC	45
3.3.3.3 Preparazione dell'RDGF (retinal derived growth factor)	46
3.3.3.4. Allestimento della coltura primaria (P0)	46
3.3.3.5. Conservazione delle HUVEC	48
3.4 Microscopio a contrasto di fase	49

3.5 Analisi statistica.....	50
4. RISULTATI.....	51
4.1 Misurazione del $\Delta\Psi_m$ su cellule circolanti ex vivo da pazienti diabetici, loro fratelli e controlli sani.....	52
4.2 Neutrofili incubati in vitro.....	54
4.3 Misurazione del $\Delta\Psi_m$ su colture cellulari.....	56
4.3.1 Fibroblasti.....	56
4.3.2 INS-1E.....	59
4.3.3 HUVEC.....	60
5.DISCOSSIONE.....	61
6.CONCLUSIONI.....	71
6.1 Misurazione del $\Delta\Psi_m$ e del burst ossidativo su cellule circolanti ex vivo da pazienti diabetici, loro fratelli e controlli sani.....	71
6.2 Misurazione del $\Delta\Psi_m$ in neutrofili umani incubati in vitro.....	71
6.3. Misurazione del $\Delta\Psi_m$ su colture cellulari.....	72
7.SVILUPPI FUTURI.....	73
8.BIBLIOGRAFIA.....	74
RINGRAZIAMENTI.....	81

Ruolo del potenziale di membrana mitocondriale come sensore glucosio-specifico nel Diabete Mellito.

RIASSUNTO:

Introduzione:

L'adeguata funzionalità cellulare richiede il mantenimento del potenziale di membrana mitocondriale ($\Delta\Psi_m$), sostenuto dalla catena di trasporto degli elettroni. Stress ossidativo e disfunzione mitocondriale sono ritenuti d'importanza patogenetica nello sviluppo di numerose malattie cronico-degenerative, inclusa la malattia diabetica e le sue complicanze [Nishikawa et al.]. Il $\Delta\Psi_m$ può essere misurato mediante citometria a flusso utilizzando coloranti cationici lipofilici, come il JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide). Questo fluorocromo si localizza a livello della membrana mitocondriale sotto forma di aggregati che danno fluorescenza rossa (FL2), mentre resta in forma monomerica (fluorescenza verde, FL1) a livello citoplasmatico, quando ci sia una caduta del $\Delta\Psi_m$. Si utilizzano agenti disaccoppianti, per esempio il carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP), come controllo positivo per verificare il collasso del $\Delta\Psi_m$. Per la rilevazione qualitativa della produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), prodotti dall'attività della NADPH ossidasi, è possibile usare una sonda non fluorescente, la Dihydrorhodamine-123 (DHR). La DHR, in seguito all'attivazione da parte dei ROS, viene convertita in rhodamina-123 la quale si localizza preferenzialmente all'interno dei mitocondri, ed esibisce fluorescenza verde. La misurazione della fluorescenza è una valutazione indiretta del metabolismo ossidativo cellulare.

Scopo della tesi:

Obiettivi della nostra ricerca sono stati: 1) misurare mediante il fluorocromo JC-1 il $\Delta\Psi_m$ di leucociti polimorfonucleati da pazienti diabetici tipo 1, loro fratelli non diabetici e soggetti di controllo; 2) misurazione della produzione di ROS nei tre gruppi di pazienti suddetti mediante la sonda DHR; 3) applicazione della metodica per la misurazione del $\Delta\Psi_m$ in citometria a flusso a colture cellulari in monostrato.

Materiali e metodi:

Metodica di misurazione del $\Delta\Psi_m$ su cellule circolanti ex vivo:

100 μ l di sangue intero di 20 pazienti con diabete di tipo 1 (12 donne), di 20 loro fratelli di primo grado (12 donne) e di 25 soggetti sani di controllo (16 donne) sono stati incubati con 20 μ mol/l di JC-1 per 15 minuti a 37°C in presenza o in assenza di 100 μ mol/l di CCCP. Dopo lisi eritrocitaria (3 ml di soluzione lisante NH_4CL 155mmol/L, KHCO_3 10mmol/L), i neutrofili sono stati analizzati mediante FACScalibur (BD Biosciences, Milano, e programma di analisi dei dati CELL Quest) con l'acquisizione di 10000 cellule per campione attraverso il *gate* dei granulociti. Per misurare la produzione di ROS utilizzando la sonda DHR, 100 μ l di sangue intero sono stati incubati con 5 μ mol/l di DHR per 15 minuti a 37°C in presenza o in assenza di 1 μ mol/l di Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), utilizzato come controllo positivo. Abbiamo poi indagato se, incubando i leucociti umani con concentrazioni crescenti di glucosio e/o insulina, si riscontravano variazioni del $\Delta\Psi_m$: 100 μ l di sangue prelevato in EDTA sono stati incubati a 37°C per un tempo compreso tra i 15 minuti e le 24 ore con concentrazioni di glucosio che variavano tra 5 e 44 mmol/l e/o di insulina umana in concentrazioni variabili tra 10 e 192 μ U/mL. Al termine dell'incubazione, si è proceduto alla misurazione citofluorimetrica del $\Delta\Psi_m$ leucocitario mediante JC-1, con o senza CCCP.

Metodica di misurazione del $\Delta\Psi_m$ su culture cellulari:

Sono state utilizzate colture cellulari di fibroblasti, INS-1E e HUVEC. I fibroblasti sono stati isolati dalla cute di donatori. La cute, una volta raccolta, è stata tritata e digerita per due ore in una soluzione allo 0,20% di collagenasi I sciolta in Dulbecco's modified Eagle's medium privo di siero, a 37°C. La linea clonale di cellule β , INS-1E, è stata coltivata in atmosfera umidificata al 5% di CO_2 , in terreno completo composto da RPMI 1640 arricchito con il 10% di siero fetale bovino, 1mmol/l di

sodio piruvato, 50 $\mu\text{mol/l}$ di 2-mercaptoetanolo, 2 mmol/l di glutamina, 10 mmol/l di Hepes, 100 U/ml di penicillina e 100 $\mu\text{g/ml}$ di streptomycin, e piastrate ad una densità di 4×10^4 cellule / cm^2 in fiasca da 75 cm^2 .

Le HUVEC sono state estratte da cordone ombelicale e il terreno di coltura preparato utilizzando 400 ml di M199 (Sigma, Milano) con aggiunta di: 2,5 ml di soluzione di penicillina/streptomycin 5000 UI/ml, 10000 $\mu\text{g/ml}$ (concentrazioni finali 25 UI/ml, 50 $\mu\text{g/ml}$) (Sigma), 5 ml di glutamina 200 mmol/l (Sigma) (2 mmol/l finale), 5 ml Hepes 1M (Sigma) (10 mmol/l finale), 1,2 ml di eparina sodica 2100 UI/ml (5 UI/ml finale) (Roche), 100 ml di siero fetale bovino (FCS) scomplementato a 56 °C per 1 ora (Sigma) (20% finale) e 5 ml di fattore di crescita ottenuto da retina bovina (RDGF, 1% finale).

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata eseguita mediante il test t di Student, l'analisi della varianza e la regressione lineare semplice e multipla (software program Aabel 3, Gigawiz Ltd. Co). I dati sono espressi come media \pm DS.

Risultati:

Lo studio eseguito sui leucociti umani circolanti ha evidenziato che il valore del $\Delta\Psi\text{m}$ nei pazienti con diabete tipo 1 ($p < 0.01$) e nei loro fratelli non diabetici ($p < 0.05$) era elevato in confronto a quello riscontrato nei soggetti di controllo. La glicemia a digiuno era l'unica variabile biologica che correlava con il $\Delta\Psi\text{m}$. Dal punto di vista clinico, i tre gruppi di soggetti non differivano per età, sesso, o pressione arteriosa media. I fratelli dei diabetici tipo 1 avevano un BMI lievemente superiore rispetto ai controlli. Dal punto di vista biochimico, i pazienti con diabete tipo 1 avevano livelli superiori alla norma di glicemia e HbA1c; i loro fratelli differivano dai controlli per glicemia a digiuno lievemente maggiore ($p < 0.05$), HbA1c ($p < 0.01$) e HOMA-IS (homeostasis model assessment of insulin sensitivity 0.48 ± 0.20 vs 0.70 ± 0.43 , $p < 0.05$) minori. L'intensità della fluorescenza emessa dalla DHR nei leucociti in condizioni basali era sovrapponibile nei tre gruppi di soggetti studiati.

I neutrofili circolanti, incubati in vitro con glucosio e/o insulina, non hanno mostrato variazioni statisticamente significative del $\Delta\Psi\text{m}$ mitocondriale. L'insulina potrebbe avere un'azione stimolante sul $\Delta\Psi\text{m}$ ($r = 0.2$, $p = 0.085$ alla regressione lineare), ma probabilmente occorrono tempi più lunghi d'incubazione per raggiungere la significatività statistica. Quando però l'incubazione a 37°C è stata

prolungata fino a 24 ore, abbiamo assistito alla progressiva depolarizzazione mitocondriale, presumibilmente in relazione all'esaurimento delle scorte metaboliche (glucosio) da parte della preponderante massa eritrocitaria. D'altra parte, come dimostrato da Beitland et al, i risultati che si ottengono studiando i polimorfonucleati in vitro differiscono da quelli riscontrati in vivo a causa di numerosi fattori (interazioni cellulari e meccanismi regolatori) che non sono riproducibili in vitro.

L'esecuzione della lettura citofluorimetrica del $\Delta\Psi_m$ su cellule in coltura ha richiesto alcuni accorgimenti tecnici per evitare artefatti legati alle proprietà adesive di tali cellule e, quindi, alla presenza di due popolazioni di cellule, singoletti e doppietti. Il citofluorimetro però, essendo uno strumento dotato di grande versatilità, permette di eseguire letture su gate mirati in modo da misurare solo l'emissione di fluorescenza dei singoletti e non dei doppietti (falsamente più alta). Per quanto riguarda i fibroblasti, l'incubazione con il glucosio non ha modificato in maniera specifica il $\Delta\Psi_m$.

Per quanto riguarda le INS 1-E, la massima stimolazione, e quindi iperpolarizzazione, è stata osservata con una concentrazione di glucosio pari a 7,5 mmol/l. Concentrazioni superiori non hanno incrementato ulteriormente il $\Delta\Psi_m$.

Infine, abbiamo applicato la metodica alle cellule endoteliali (HUVEC), riuscendo a leggere la fluorescenza del 93,2% delle cellule presenti nel campione.

Conclusioni:

Nelle famiglie di pazienti diabetici tipo 1 le oscillazioni del potenziale mitocondriale indotte dai ROS sembrano essere sincronizzate verso uno stato di iperpolarizzazione. L'associazione positiva fra il potenziale mitocondriale e la glicemia, in un range che va dallo stato normo-glicemico a quello dis-glicemico, suggerisce che l'iperglicemia aumenti la metabolizzazione del glucosio e favorisca così l'iperpolarizzazione della membrana mitocondriale. Nel nostro studio, il divario tra i risultati ex vivo (leucociti di pazienti diabetici) ed in vitro (leucociti umani incubati con concentrazioni crescenti di glucosio e/o insulina), è spiegabile considerando che in vivo intervengono interazioni ormonali e cellulari che non sono riproducibili in vitro, ma incidono sui parametri bioenergetici cellulari. La metodica citofluorimetrica permette di misurare il $\Delta\Psi_m$ anche di cellule dotate di grande adesività, come i fibroblasti, purchè si eseguano dei gate mirati sui soli singoletti. La metodica, applicata alle INS-1E, fornisce inoltre un modello sperimentale per lo studio della secrezione autocrina di insulina legata alla stimolazione con glucosio (GSIS). Infine, le Huvec, pur essendo cellule molto delicate, si mantengono vitali per oltre il 93%.

Sviluppi futuri:

Intendiamo proseguire le misurazioni del potenziale di membrana mitocondriale su cellule HUVEC isolate e sottoposte a incubazione con concentrazioni crescenti di glucosio per periodi di tempo predefiniti in modo da ottenere informazioni sull'effettivo instaurarsi di un meccanismo di memoria metabolica.

1.INTRODUZIONE:

1.1 Epidemiologia e incidenza del Diabete:

Il diabete è la più diffusa malattia metabolica presente in Italia e nel mondo occidentale; si calcola che il numero dei diabetici in Italia sia di circa 3 milioni ai quali si devono aggiungere almeno altri 2 milioni di casi non ancora diagnosticati. A fronte di una prevalenza di 3-5% di casi noti, circa il 50% dei casi di diabete mellito risulta, infatti, non ancora diagnosticato. Ogni anno sono diagnosticati circa 200.000 nuovi casi di cui circa 15000 di tipo 1 e 185000 di tipo 2. L'incidenza del diabete mellito di tipo 1 presenta una notevole difformità legata a fattori razziali o geografici, con valori che oscillano per l'Europa tra 30 casi/100000 persone/anno in Finlandia e 5-6 casi/100000 persone/anno in Grecia. In Italia i dati di incidenza relativi al diabete di tipo 1 mostrano una discreta omogeneità in tutto il territorio variando da 4.7 a 10.1 casi/100000 persone/anno ad eccezione della Sardegna dove l'incidenza è di circa 35 casi su 100000 abitanti/anno. Dai dati presenti nella letteratura mondiale emerge che il numero totale dei pazienti diabetici è di circa 230 milioni destinati a diventare 350 milioni nel 2025 (dati della IDF, International Diabetes Federation) se non si modificherà la tendenza di crescita riscontrata in questi anni. La patologia risulta infatti in aumento non solo nei Paesi ricchi, ma anche in quelli poveri, in particolare in Asia e in America Latina, a causa del cambiamento nello

stile di vita. Nel 2003, i cinque Paesi con il più grande numero di diabetici erano: India (35.5 milioni), Cina (23.8 milioni), Stati Uniti (16 milioni), Russia (9.7 milioni) e Giappone (6.7 milioni).

- Dal 2025, ci si aspetta che il numero di persone con diabete sia più del doppio in Africa, nel Mediterraneo Orientale e Medio-Orientale, nel sud-Est Asiatico e che aumenterà del 20% in Europa, del 50% nel Nord America del 85% nel centro e Sud America e del 75% nel Pacifico Occidentale.
- Ogni anno la popolazione diabetica aumenta di circa 7 milioni.
- Ogni anno, oltre tre milioni di morti sono da imputare al diabete. Ogni 10 secondi una persona muore per le complicanze del diabete.
- Il Diabete, rispetto ad altri tipi di patologie, è la quarta causa di morte nel mondo.
- Almeno il 50 % delle persone affette da diabete non ne è consapevole; in alcuni Paesi questa percentuale può raggiungere l'80%.
- Nei Paesi sviluppati il Diabete è la principale causa di difetti della vista.
- Il diabete è la principale causa di amputazione non dovuta ad incidenti ed è responsabile di oltre un milione di amputazioni ogni anno. Le persone diabetiche sono 15-40 volte più soggette ad amputazione delle dita dei piedi rispetto alla popolazione generale.
- Le persone diabetiche hanno un rischio da 2 a 4 volte maggiore di sviluppare patologie cardiache (CVD), rispetto alle persone non diabetiche. Le complicanze cardiache sono la causa numero uno di morte.
- Le complicazioni devastanti del diabete come la retinopatia, la nefropatia e le complicanze cardiache, impongono misure urgenti nei servizi di sanitari che si occupano della prevenzione e della cura. E' stato stimato che il diabete corrisponde al 5-10% della spesa sanitaria nazionale.

- I costi umani ed economici del diabete possono essere significativamente ridotti investendo nella prevenzione, soprattutto nella diagnosi precoce, al fine di evitare le complicazioni del diabete.

In conclusione, possiamo affermare che un buon controllo della glicemia può sostanzialmente ridurre il rischio di sviluppare le complicazioni del diabete e rallentarne la progressione.

1.2 Il ruolo dello Stress Ossidativo

Una caratteristica comune, tanto nel diabete di tipo 1 che in quello di tipo 2, è il deficit assoluto o relativo di secrezione insulinica da parte delle cellule beta pancreatiche. Meccanismi effettori comuni possono causare questo deficit: fattori immunologici nel diabete di tipo 1 e fattori metabolici/infiammatori in quello di tipo 2 convergono su comuni vie di trasduzione del segnale che conducono alle alterazioni funzionali e alla distruzione cellulare, e si ritiene che lo stress ossidativo svolga un ruolo fondamentale sia nel determinismo del deficit funzionale che nel causare la progressiva perdita delle cellule beta [1]. Nel diabete di tipo 1 le cellule beta sono il bersaglio di un attacco autoimmune, con infiltrazione delle isole pancreatiche da parte di cellule mononucleate (insulite). La morte delle cellule beta durante l'insulite è probabilmente causata dal contatto diretto con macrofagi attivati e cellule T e/o dall'esposizione a mediatori solubili secreti da queste cellule come ad es. citochine, ROS (specie reattive dell'ossigeno) e NO (ossido nitrico). Nel diabete di tipo 2 l'iperglicemia, spesso associata ad iperlipidemia, si traduce in un'aumentata produzione mitocondriale del radicale superossido con conseguente aumentata esposizione delle cellule ai ROS [2]. L'eccessiva produzione di ROS favorisce inoltre l'induzione di ossido nitrico sintetasi inducibile (iNOS) e quindi un'aumentata produzione di NO: la contemporanea presenza di aumentati livelli di

anione superossido e di NO favorisce a sua volta la formazione di anione perossinitrito citotossico. Bisogna inoltre considerare che le cellule beta sono particolarmente vulnerabili al danno ossidativo, in quanto la loro dotazione di difese antiossidanti è significativamente più bassa rispetto a quella di altri tipi cellulari [3]. Condizioni di aumentato stress ossidativo concorrono anche a determinare molte delle complicazioni cliniche del diabete. Uno stato generale di stress ossidativo nel paziente diabetico si può inferire dai livelli elevati di biomarcatori di stress ossidativo e dai livelli generalmente diminuiti di importanti antiossidanti quali le vitamine E e C. Studi condotti mediante inibitori della fosforilazione ossidativa hanno evidenziato recentemente che lo squilibrio redox ha probabilmente origine nei mitocondri, dove l'esposizione ad elevate concentrazioni di glucosio induce un aumento nella produzione di ROS [4]. L'iperglicemia stimola comunque la formazione di ROS con una serie di altri meccanismi, che coinvolgono l'azione diretta del glucosio e l'attivazione di diverse attività enzimatiche quali la NADPH ossidasi, la xantina ossidasi, le lipossigenasi, la famiglia del citocromo P450 e le ossido nitrico sintetasi [5]. Il glucosio può reagire direttamente con gli aminogruppi di aminoacidi, peptidi e proteine, portando alla formazione prima di basi di Schiff e successivamente alla comparsa di carbonili su queste strutture (glicazione delle proteine: *reazioni di Maillard*). Le molecole modificate (denominate nel loro insieme AGE, *advanced glycation end-products*) vanno facilmente incontro ad aggregazione. Si ritiene che il fenomeno partecipi, oltre alle alterazioni tissutali tipiche del diabete in vari distretti, anche al processo generale di invecchiamento dell'organismo, diabetico o meno. L'iperglicemia sembra inoltre aumentare l'espressione e l'attività della NOS a livello vascolare con aumentati livelli di NO, tanto da far parlare di un vero e proprio "stress nitrosativo" nel diabete [6]. Si è anche osservato che le vie metaboliche attivate dal glucosio in eccesso non sono indipendenti, ma intimamente correlate e in grado di potenziarsi a vicenda; ognuna di queste vie può rappresentare un crocevia importante da cui le altre originano o su cui convergono e, quindi, un possibile obiettivo per un intervento terapeutico o preventivo mirato a bloccare la cascata di eventi innescata dall'iperglicemia.

Un ruolo primario nei fenomeni ossidativi è svolto anche dal complesso enzimatico NADPH ossidasi, la cui attivazione è stata dimostrata a livello di vari tipi cellulari (macrofagi e neutrofili, ma anche fibroblasti, miocardiociti, cellule endoteliali e cellule muscolari lisce). La protein chinasi C (PKC) e l'angiotensina II sono coinvolte nell'attivazione della NADPH ossidasi, il che consente di stabilire punti di contatto anche con la patogenesi dell'ipertensione [7].

Lo schema riportato in Figura 1 offre una sinossi delle specie biochimiche e dei bersagli molecolari coinvolti, evidenziando le complesse interazioni che legano l'uno all'altro i vari fenomeni.

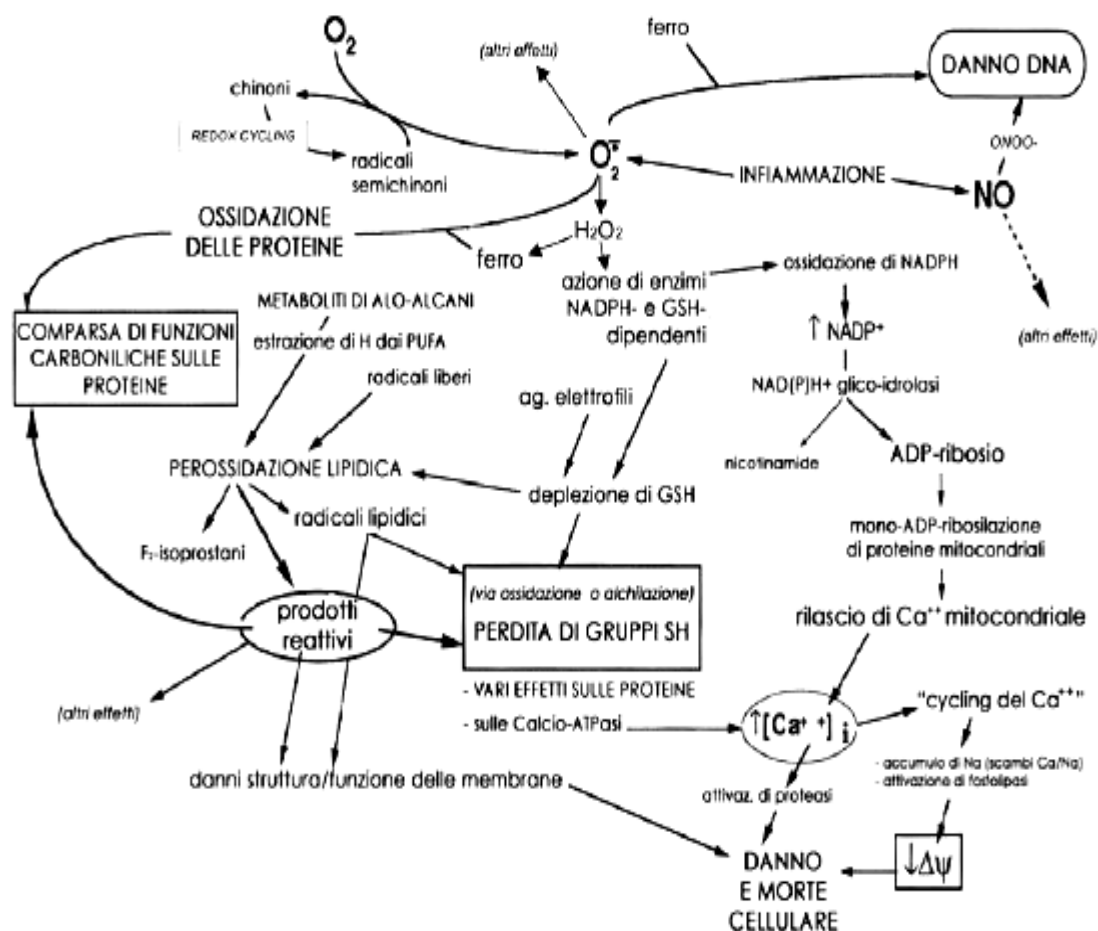


Figura 1: Sinossi dei processi biochimici che possono aver luogo durante uno stress ossidativo e delle principali specie molecolari coinvolte del danno cellulare^a.

^aSpecie reattive dell'ossigeno sono continuamente prodotte nel corso di normali reazioni fisiologiche. L'anione superossido può inoltre originare dalle reazioni di *redox cycling* innescate da farmaci ed altri xenobiotici, ma anche da composti endogeni. La dismutazione del superossido, – spontanea o catalizzata da superossido dismutasi, – porta alla comparsa di acqua ossigenata. Il metabolismo di quest'ultima da parte della glutatione perossidasi porta alla deplezione del glutatione (GSH); l'attività della GSH reduttasi nella riduzione del glutatione ossidato porta a sua volta ad una deplezione di NADPH. La deplezione del GSH rende la cellula più suscettibile alla perossidazione lipidica, un processo che può anche essere messo in moto direttamente da alcuni agenti tossici, gli alo-alcanti. I prodotti reattivi della perossidazione lipidica (aldeidi, carbonili, lipoperossidi) possono legarsi sulle proteine, provocando così una perdita di gruppi sulfidrilici, cosa che può inoltre derivare dalla ossidazione e deplezione del GSH ridotto. Aldeidi insature derivate dalla frammentazione dei lipidi (4-idrossi-nonenale innanzitutto) possono legarsi ai sulfidrilici delle proteine, conservando la loro funzione carbonilica; le proteine presenteranno pertanto un aumentato contenuto di carbonili. La comparsa di carbonili sulle proteine cellulari può anche risultare da una ossidazione diretta dei residui aminoacidici, processo catalizzato da ioni di ferro ed altri metalli (ossidazione proteica catalizzata da metalli). Ferro-ioni sono anche implicati nella promozione di perossidazione lipidica in presenza di acqua ossigenata, come pure nel danno ossidativo al DNA indotto dai ROS (specie reattive dell'ossigeno). L'aumento intracellulare del NADP⁺ può innescare la ADP-ribosilazione delle proteine mitocondriali, fenomeno che provoca rilascio di calcio mitocondriale nel citoplasma. Il prolungato innalzamento del calcio citosolico [Ca⁺⁺] risulta inoltre dalla ossidazione di sulfidrilici critici nelle Ca-ATPasi della plasma membrana; la conseguenza finale di ciò può essere la perdita di potenziale della membrana mitocondriale.

La lista delle patologie umane in cui si può dimostrare un coinvolgimento di reazioni di stress ossidativo è lunga e in continuo aggiornamento (Tab. 1). In una prospettiva medico-clinica, al di là delle caratteristiche biochimiche e molecolari, altri aspetti dello stress probabilmente acquistano maggiore rilievo. Infatti, nel considerare il reale significato delle reazioni ossidative che possono comparire durante un processo patologico, è spesso difficile discriminare se e quanto esse agiscano come causa iniziale dei fenomeni di malattia, se e quanto esse partecipino ai meccanismi patogenetici del danno che si sta producendo nei tessuti, oppure se esse compaiano solo come uno degli effetti collaterali del processo [8]. Gli sforzi maggiori del ricercatore clinico sono costantemente rivolti a chiarire questi aspetti, che possono di volta in volta variare nelle diverse patologie o anche in stadi successivi di una stessa patologia.

Tra le sostanze che macrofagi e granulociti secernono nei tessuti nel corso dei processi infiammatori, gli agenti ossidanti svolgono ruoli di primo piano in quella che comunemente si definisce l'immunità "naturale" (azione tossica sui patogeni, modulazione del microcircolo, coordinamento delle reazioni immunitarie iniziali). L'azione di diverse attività enzimatiche porta alla comparsa di specie

molecolari dotate di notevole reattività, derivate dall'ossigeno (ROS) e dall'azoto (RNS). Tra le due famiglie di composti esistono interazioni, che portano ad es. alla formazione del composto altamente reattivo perossinitrito e si ripercuotono sul processo fisiopatologicamente rilevante della nitrosazione delle proteine.

In contrasto all'azione di difesa fisiologica, le specie ossidanti possono produrre nei tessuti infiammati anche una grande varietà di effetti dannosi, la cui intensità concorre essa stessa ad originare fenomeni patologici. Nel caso ad es. delle infiammazioni polmonari, l'eccessiva attivazione dei neutrofili può causare la necrosi delle strutture epiteliali e vascolari e la degradazione della matrice connettivale, condizioni che sono alla base della sindrome da *distress* respiratorio acuto (ARDS, Acute Respiratory Distress), della malattia ostruttiva cronica (COPD, Chronic Ostruttive Polmonary Disease) e della fibrosi polmonare [9-10]. Il danno tissutale si determina in seguito agli effetti di ROS e RNS a livello molecolare, su proteine, lipidi ed acidi nucleici.

L'azione pro-ossidante/attivante sui fattori di trascrizione nuclear *factor kappa-B*, (NF-kB) e *activator protein-1*, (AP-1), responsabili dell'espressione di interleuchine chemiotattiche e proinfiammatorie della famiglia di interleuchina 8 (IL-8), è inoltre un meccanismo per alimentare e perpetuare il processo infiammatorio. L'artrite reumatoide, la grave malattia autoimmune che causa infiammazione cronica delle articolazioni e dei tessuti peri-articolari con infiltrazione di macrofagi e linfociti T, offre un altro esempio del ruolo patogenetico di radicali liberi e specie ossidanti. Nel liquido sinoviale e nel siero di questi pazienti è possibile evidenziare aumentati livelli di F2-isoprostani, prodotti della perossidazione lipidica analoghi alle prostaglandine [11]. Nei linfociti T isolati dalle articolazioni colpite si evidenziano diminuiti livelli di glutathione ridotto (GSH), e le conseguenti condizioni di stress ossidativo sembrano all'origine dell'anomala attivazione cellulare, in quanto responsabili ad es. di alterazioni della fosforilazione della proteina adattatrice *linker for activation of T cell* (LAT) e dell'espressione di diverse molecole di adesione [12].

Processi infiammatori Alcune glomerulo nefriti, malattie autoimmuni, artrite reumatoide	Altre patologie Diabete, alcolismo, danno epatico tossico, pancreatite acuta	Patologie della pelle Porfirie, danno da radiazioni
Patologie respiratorie Effetti del fumo di sigaretta, enfisema, danno ipertossico, fibrosi cistica, tossicità da ozono, NO ₂ e SO ₂ , ARDS, asbestosi, fibrosi polmonare	Ischemia-riperfusione Infarto del miocardio, ictus, trapianti d'organo	Patologie renali Effetti cronici della terapiadialitica, tossicità da metalli pesanti
Patologie neurologiche Morbo di Alzheimer, morbo di Parkinson, sclerosi multipla, distrofie muscolari, tossicità da alluminio	Patologie oculari Cataratta, degenerazioni retiniche	Patologie ematologiche Anemia falciforme, favismo, anemia di Fanconi, malaria, danno da farmaci
	Pat. Cardiovascolari Miocardiopatia alcolica, aterosclerosi, ipertensione, cardiotossicità della doxorubicina	Invecchiamento

Tab.1: Le principali patologie umane in cui e' stato ipotizzato un ruolo patogenetico per le reazioni di stress ossidativo.

1.3 I Mitochondri:

I mitocondri sono organelli che intervengono nel metabolismo cellulare, anabolismo e catabolismo. L'anabolismo comprende le reazioni endo-ergoniche e biosintetiche, il catabolismo comprende solo le eso-ergoniche. Queste ultime rappresentano il metabolismo energetico, mentre quelle anaboliche rappresentano il metabolismo biosintetico. Nell'ambito delle reazioni cataboliche, i mitocondri intervengono quando zuccheri, proteine e lipidi sono già stati demoliti in unità carboniose più semplici e con produzione di una certa quantità di ATP. Dalla glicolisi, infatti, il glucosio viene convertito in piruvato, con produzione di ATP. In condizioni aerobiche il piruvato entra nei mitocondri dove viene decarbossilato e convertito in acetil coenzima A il quale, a sua volta, entra nel ciclo di Krebs e viene completamente ossidato a CO_2 e H_2O . La decarbossilazione ossidativa del piruvato per formare acetil CoA avviene nella matrice mitocondriale e rappresenta il legame tra la glicolisi (che avviene nel citosol) e il ciclo di Krebs. Se invece il rifornimento di ossigeno è insufficiente, come nel muscolo che sta attivamente contraendosi, il piruvato è convertito in lattato. Dalla demolizione di tali molecole vengono prodotti anche equivalenti riducenti che sono trasportati dal NAD^+ e dal FAD , i quali passano dalla forma ossidata a quella ridotta: $\text{NADH} + \text{H}^+$ e FADH_2 . Questi ultimi sono molecole ricche di energia in quanto contengono una coppia di elettroni con un elevato potenziale di trasferimento. Questi elettroni sono trasferiti dal NADH oppure dal FADH_2 all'ossigeno attraverso una serie di trasportatori di elettroni.

Questo processo, chiamato fosforilazione ossidativa (fig 3), ha luogo nella membrana interna dei mitocondri e rappresenta la principale fonte di ATP negli organismi aerobici. Dal punto di vista energetico, la totale ossidazione del glucosio ad acqua e anidride carbonica tramite glicolisi, decarbossilazione del piruvato ad acetil-CoA e ciclo ossidativo terminale corrisponde, per mole di glucosio, a 38 moli di ATP così distribuite: 8 moli durante la glicolisi, 6 moli per due moli di

piruvato trasformate in due moli di acetil-CoA, 24 moli nel ciclo terminale per 2 moli di acetato ossidato. I mitocondri quindi sono paragonabili ad una centrale energetica, attraverso la quale si collegano i tre principali processi deputati alla produzione di energia:

- 1) Glicolisi;
- 2) Ciclo di Krebs;
- 3) Fosforilazione ossidativa.

Questo è possibile grazie alla particolare organizzazione strutturale dei mitocondri (Fig 2)

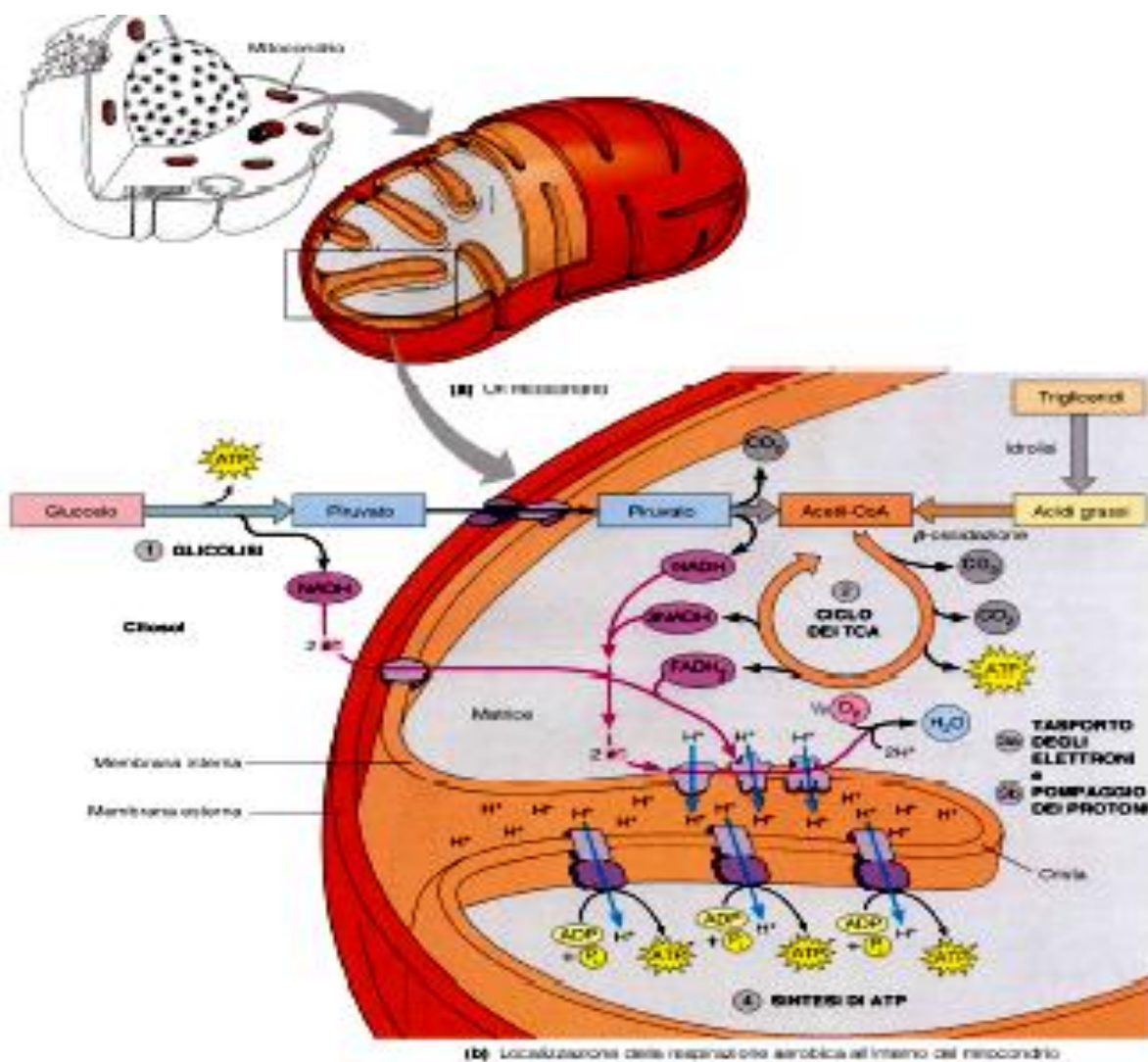


Fig 2: Organizzazione strutturale interna dei mitocondri.

Ogni mitocondrio è circondato da una membrana a due strati; la membrana esterna è relativamente permeabile e contiene enzimi che convertono substrati lipidici in forme che possono essere metabolizzate nei mitocondri; la membrana interna è ripiegata nelle cosiddette **creste** che occupano la cavità interna, riempita di una sostanza amorfa chiamata **matrice**. La matrice contiene un certo numero di granuli densi, i **granuli della matrice**, la cui natura e funzione sono ancora non completamente note. La membrana mitocondriale interna è separata da quella esterna da uno stretto **spazio intermembranoso**, che si estende in ogni cresta (Fig.2).

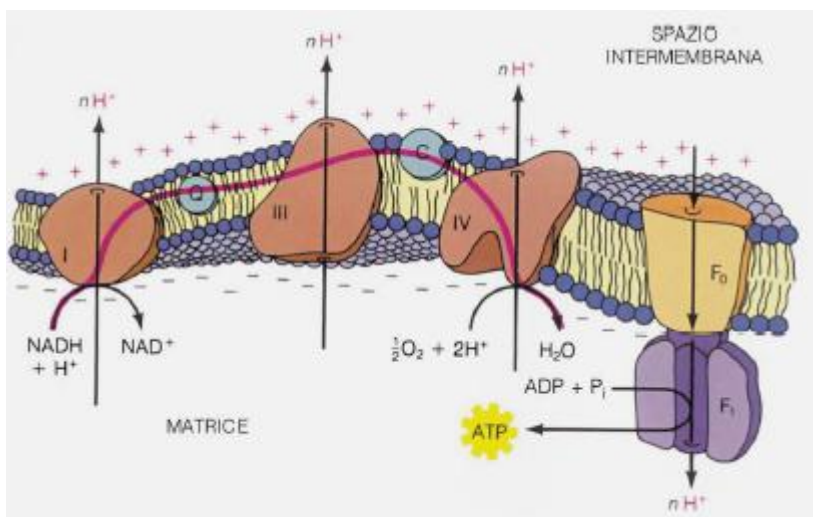


Fig.3: Organizzazione della membrana mitocondriale interna dove sono presenti i complessi deputati al trasporto degli elettroni

La respirazione aerobica ha luogo nella matrice e nella membrana mitocondriale interna e questo processo è incrementato dalla grande superficie offerta dalle creste. La matrice contiene la maggior parte degli enzimi coinvolti nell'ossidazione degli acidi grassi e nel ciclo di Krebs (o ciclo degli acidi tricarbossilici); sono inoltre presenti DNA mitocondriale ed RNA. La membrana mitocondriale interna contiene i **citocromi**, le molecole che costituiscono la catena di trasporto degli elettroni, e gli enzimi coinvolti nella produzione di ATP. I mitocondri sono considerati **organuli semiautonmi**, perché riescono a sintetizzare molte delle proteine di cui necessitano; inoltre, vanno incontro ad un'autoreplicazione mediante un processo che è analogo alla divisione dei batteri.

La fosforilazione ossidativa mitocondriale permette la produzione di ATP mediante il complesso dell'ATP sintetasi. Il piruvato derivato dalla glicolisi viene ossidato nei mitocondri attraverso il ciclo dell'acido tricarbossilico, generando NADH e FADH₂ che, a loro volta, forniscono elettroni alla catena respiratoria.

Il trasferimento di elettroni è guidato dal potenziale riducente dei trasportatori di elettroni della catena respiratoria a livello della membrana interna (Fig 3): la NADH deidrogenasi (Complesso I), la succinato deidrogenasi (Complesso II), la Citocromo C reduttasi (Complesso III) e la Citocromo C ossidasi (Complesso IV).

I complessi ossido-riducenti I, III e IV accoppiano il trasporto degli elettroni con la traslocazione di protoni dalla matrice mitocondriale allo spazio intermembrana [13]. La caduta del potenziale redox durante il trasferimento di elettroni genera la forza motrice per i protoni (Δp) che porta alla generazione di ATP. L'energia libera resa disponibile dal flusso di elettroni è accoppiata al trasporto endoergonico di protoni nello spazio intermembrana da parte dei complessi I, III e IV attraverso la membrana mitocondriale interna. Si genera così una forza elettromotrice protonica che spinge i protoni dallo spazio intermembrana verso la matrice. Poiché la membrana interna è impermeabile ai protoni, questi per rientrare devono attraversare il canale transmembrana specifico del settore F₀ della ATP sintasi (o

complesso V). La forza motrice che spinge i protoni verso la matrice fornisce l'energia necessaria alla sintesi di ATP, catalizzata dal settore F1 della ATP sintasi.

La forza motrice per i protoni consiste in un gradiente elettrico ($\Delta\Psi_m$, rappresenta la differenza nel potenziale elettrico tra il citoplasma e la matrice mitocondriale) trans-membrana, negativo di circa 180-200 mV e in un gradiente chimico (ΔpH) di circa 1 U attraverso la membrana mitocondriale interna. Il Δp a 37°C è dato dall'equazione:

$$\Delta p \text{ (mV)} = \Delta\Psi_m - 61,5 \log_{10} \Delta pH$$

Per ogni paio di elettroni che viene trasferito dal NADH all'ossigeno, dieci protoni sono pompati attraverso la membrana mitocondriale interna (Fig 3) [14].

Gli elettroni sono trasferiti all'accettore finale, l'ossigeno molecolare, che è convertito ad acqua attraverso quattro riduzioni sequenziali da parte degli elettroni. Una parziale riduzione degli elettroni può generare specie reattive dell'ossigeno. Durante il normale metabolismo cellulare la produzione mitocondriale di ROS dipende dal rapporto NADH/NAD⁺ e dal $\Delta\Psi_m$, sia attraverso il "trasporto inverso degli elettroni" in presenza di succinato, sia attraverso un'ossidazione incompleta del NADH durante il trasferimento degli elettroni.

I ROS possono essere anche prodotti nella membrana esterna dei mitocondri, attraverso l'azione della α -chetoglutarato deidrogenasi e della monoamina-ossidasi [15]. A livello del ciclo di Krebs invece, la α -chetoglutarato deidrogenasi determina il flusso metabolico e la produzione di NADH ed è capace di generare ROS durante la sua azione catalitica, a sua volta regolata dal rapporto NADH/NAD⁺ [16]. La degradazione di amine biogeniche da parte della monoamina ossidasi genera ROS, i quali partecipano alla cascata di segnali indotta dalla serotonina e dalla tiramina [17]. La catena elettronica mitocondriale consiste di quattro complessi maggiori multi-subunità (I, II, III, IV), ma anche di ATP sintetasi (Complesso V), ADP/ATP traslocasi, NADH/NADP trans-idrogenasi e altre proteine coinvolte in vie

alternative di trasferimento degli elettroni. L'organizzazione delle proteine di membrana mitocondriale in super-complessi faciliterebbe la canalizzazione dei substrati o, in alternativa, manterrebbe in stretta vicinanza reazioni consecutive di catalizzazione enzimatica. E' stato ipotizzato che un pool mobile di CoQ nella membrana mitocondriale interna sia in equilibrio con il CoQ legato alle proteine di trasporto per servire come riserva per i complessi I-III.

Il mantenimento di una significativa differenza di potenziale elettrico attraverso le membrane biologiche è cruciale per una varietà di funzioni cellulari come l'accrescimento, il movimento, la trasduzione di segnali e il bilancio energetico [18]. Organelli intracellulari come i mitocondri sono implicati nell'omeostasi del sistema immunitario in quanto funzionano da centrale di integrazione degli stimoli apoptotici e posseggono funzioni correlate proprio con il loro potenziale di membrana $\Delta\Psi_m$. La depolarizzazione mitocondriale è associata a variazioni nella permeabilità della membrana mitocondriale esterna (che possono preludere all'apoptosi) ed è indotta da numerosi effettori come i ROS o il blocco della catena respiratoria [19].

Nel lavoro di Sivitz et al [20], viene approfondita la relazione fra diabete di tipo 1, diabete tipo 2 e mitocondri. Alterazioni del numero e della morfologia dei mitocondri sono state riscontrate in vari organi e tessuti come il fegato, il tessuto muscolare e quello adiposo. Sembra che esista un filo conduttore diretto che collega le alterazioni mitocondriali a livello di fosforilazione ossidativa e potenziale di membrana con una condizione di insulino-resistenza e insulino deficienza.

1.4 L'apoptosi

L'apoptosi è un fenomeno che non colpisce una popolazione di cellule in toto, ma singole cellule senza che si sia stabilita precedentemente alcuna patologia. La sequenza stereotipata di eventi molecolari, biochimici e morfologici dell'apoptosi richiede una regolazione molto fine, accompagnata da una sia da una specifica espressione genica e sintesi proteica, sia da un alto consumo di energia sotto forma di ATP. L'insieme di queste evidenze ha portato fin dall'inizio a pensare che si trattasse di una forma di morte cellulare programmata (*Programmed Cell Death*, PCD), diretta, totalmente o in parte, dalla cellula apoptotica stessa a partire da stimoli esogeni o endogeni di natura diversa.

Attualmente la morte per apoptosi è un fenomeno ben conosciuto che fa parte integrante dello sviluppo di ogni organismo a livello embrionale e fetale, non che dell'omeostasi tissutale nell'adulto.

Numerosi studi condotti nell'uomo hanno appunto evidenziato il coinvolgimento dei processi apoptotici a diversi livelli: nello sviluppo embrionale [21], nell'inattivazione delle risposte immunitarie [22], nello sviluppo del sistema nervoso centrale [23-24], nel turnover cellulare [25], nella selezione timica [26], nell'eliminazione delle cellule bersaglio in corso di reazioni di citotossicità [27].

Inoltre, in numerosi processi patologici, come ad esempio nelle infezioni virali (AIDS), nei tumori, nelle malattie autoimmuni e neurodegenerative, la deregolazione dell'apoptosi può essere alla base o una delle cause della patogenesi della malattia stessa [28; 29;30;31].

Apoptosi e necrosi sono due fenomeni che possono contemporaneamente esistere in uno stesso tessuto o essere sequenziali, ma l'aspetto morfologico delle cellule colpite da questi due processi è talmente caratteristico da permettere all'osservatore una facile distinzione.

A differenza della cellula necrotica che si rigonfia e si lisa, la cellula apoptotica riduce il suo volume, si condensa, perde ogni contatto con le cellule vicine e tutte le specializzazioni presenti sulla sua membrana plasmatica. Vengono esposte molecole riconoscibili dalle cellule vicine le quali possono così operare la fagocitosi della cellula apoptotica. All'interno della cellula, tutti gli organuli persistono e

rimangono intatti ad eccezione del mitocondrio, che va incontro a rigonfiamento, e del nucleo, all'interno del quale il nucleolo si disgrega e la cromatina si condensa. Il materiale nucleare così modificato si porta sulla superficie interna della membrana nucleare e viene rotto in frammenti di lunghezza costante (180-200 pb o multipli interi). Il nucleo presenta un aspetto caratteristico e viene definito picnotico. I frammenti di materiale nucleare raggiungono la membrana plasmatica, vengono circondati da evaginazioni della membrana stessa e conferiscono alla cellula un aspetto a bolle (definito *blebbing*). Queste bolle, che contengono al loro interno sia materiale nucleare che parte del citoplasma, si staccano dalla cellula dando origine ai corpi apoptotici. I corpi apoptotici vengono quindi fagocitati dalle cellule vicine per un meccanismo di endocitosi, che impedisce la perdita del materiale citoplasmatico ed il verificarsi di fenomeni infiammatori [32; 33].

I mitocondri sono considerati amplificatori di segnali cellulari, capaci di generare e trasportare ROS e di generare segnali elettrici e ionici, sono inoltre implicati nell'omeostasi del sistema immunitario [34]. A questo livello i meccanismi dell'apoptosi regolano:

- lo sviluppo dei linfociti T (modulando i fenomeni di selezione positiva/negativa e coordinando gli eventi che portano alla risposta immunitaria).
- la sopravvivenza e la proliferazione di monociti/macrofagi
- la sopravvivenza e l'attività fagocitaria dei neutrofili.

I polimorfonucleati (PMN) sono dotati di un sistema mitocondriale che è essenziale per processi come la chemiotassi, l'apoptosi, la fagocitosi ecc [35]. I polimorfonucleati mantengono il $\Delta\Psi_m$ mitocondriale attraverso una serie di quattro proteine (glycerol-3-phosphate shuttle I, II, III, IV), presenti nella membrana mitocondriale interna e deputate al trasporto degli elettroni derivati dall'ossidazione da parte del complesso I del NADH o dall'ossidazione del succinato da parte del complesso II. I complessi I, III e IV fungono da scambiatori di protoni e mantengono il $\Delta\Psi_m$ mitocondriale trasferendo elettroni ad un complesso successivo o ad una molecola di ossigeno, con un concomitante spostamento di protoni all'esterno della matrice mitocondriale [36]

I mitocondri rappresentano, quindi, un elemento cruciale per la vitalità e l'omeostasi cellulare e, allo stesso tempo, un bersaglio di molte condizioni patologiche come il Diabete e le sue complicanze.

Molta della nostra conoscenza della funzione mitocondriale deriva dallo studio di sostanze tossiche per la catena respiratoria. Inibitori specifici sono stati usati per distinguere il sistema di trasporto dell'elettrone dal sistema di fosforilazione ed hanno aiutato a definire le varie componenti della catena respiratoria. Per la nostra ricerca abbiamo usato l'agente disaccoppiante CCCP (carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone), come controllo positivo per verificare il collasso del potenziale di membrana mitocondriale. Questo composto abolisce il collegamento fra la catena respiratoria e il sistema di fosforilazione e distrugge il potenziale di membrana. Per monitorare le variazioni nel $\Delta\Psi_m$ mitocondriale abbiamo utilizzato un nuovo substrato voltaggio-sensibile e fluorescente come il JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide), che entra selettivamente nei mitocondri.

1.5 La memoria Metabolica

Il Diabete di Tipo 1 è associato con un aumentata incidenza di patologie macrovascolari [37]. Ciò è dovuto, in parte, alle comorbidità tipiche del diabete (ipertensione e dislipidemia) e, in parte, all'iperglicemia stessa, che gioca un ruolo significativo nello sviluppo delle complicanze croniche del Diabete.

Il danno endoteliale è il maggior predittore di insorgenza di patologie cardiovascolari, anche nel Diabete. Tutti i fattori di rischio coinvolti nella patogenesi delle patologie cardiovascolari, possono essere ricondotti ad un danno a livello endoteliale [38]. Comunque, sebbene numerosi studi abbiano dimostrato che l'iperglicemia induce una disfunzione endoteliale, sia in soggetti diabetici che in non diabetici, una dimostrazione chiara del fatto che un buon controllo glicemico possa revertire una situazione di danno endoteliale ancora non è stata fornita. Numerosi studi dimostrano che l'iperglicemia induce un danno a livello endoteliale attraverso la generazione di ROS, che giocano un ruolo centrale nello sviluppo delle complicanze sia macro che micro vascolari associate al Diabete [39]

Alla base del meccanismo di danno causato dall'iperglicemia vi è l'alterazione delle proteine mitocondriali e l'iperproduzione di radicali liberi. Recenti studi hanno dimostrato che bastano poche settimane con livelli di glicemia elevata per danneggiare l'organismo (anche se la glicemia poi rientra nei valori di riferimento).

Questo meccanismo di danno “postumo” è stato chiamato memoria metabolica e alla base vi è un'alterazione delle proteine dell'organismo, incluse quelle mitocondriali.

The vicious circle of the “Metabolic Memory”

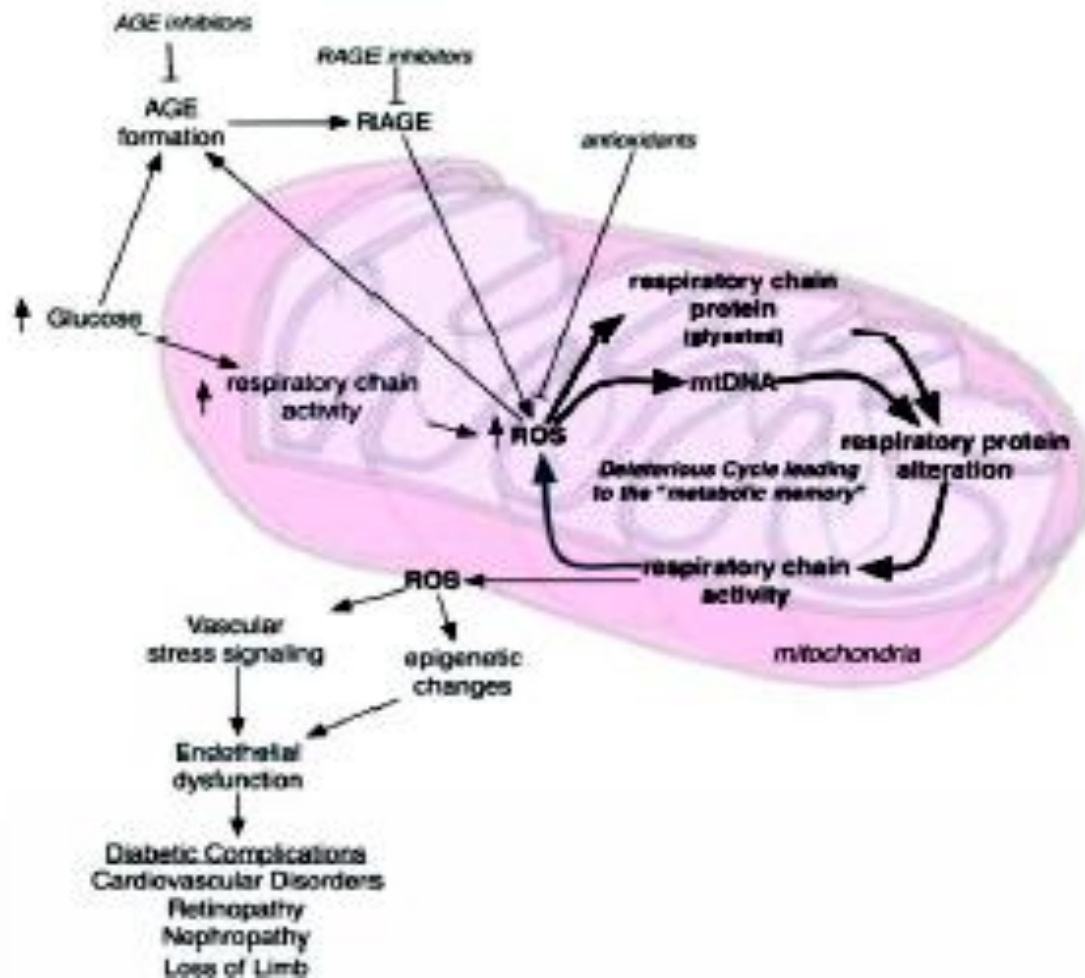


Fig.4: Il “circolo vizioso” della memoria metabolica (Ceriello, 2008).

Quando il glucosio in eccesso presente nel sangue, si lega alle proteine mitocondriali, ed in particolare ai complessi proteici deputati al trasporto degli elettroni, si innesca la produzione di radicali liberi che possono danneggiare i complessi stessi e tutta una serie di macromolecole in altre parti della cellula. Infatti, quando i complessi proteici della catena di trasporto degli elettroni sono disaccoppiati o mal funzionanti, gli elettroni vengono trasferiti a molecole come l'O₂, formando superossido (O₂⁻) e altre specie reattive dell'ossigeno le quali, essendo sostanze ossidanti,

danneggiano i tessuti e in modo particolare l'endotelio e le beta-cellule (le cellule che producono insulina). Una volta che le proteine mitocondriali sono state glicosilate, i mitocondri continuano a produrre radicali liberi anche quando i livelli di glicemia tornano nella norma. Proprio per questo motivo alcuni pazienti diabetici, nonostante un buon controllo metabolico, col tempo sviluppano le complicanze tipiche della malattia: retinopatia, neuropatia diabetica, insufficienza renale ed infarto del miocardio [40].

La ricerca che ha condotto alla scoperta della memoria metabolica è stata condotta su topi e su colture di cellule endoteliali. Nel caso delle cellule endoteliali, la modificazione delle proteine mitocondriali avviene già dopo due settimane di iperglicemia, ma alcune sostanze antiossidanti sono in grado di modificare la memoria metabolica delle cellule. Nello studio sui topi, sono stati studiati per tre settimane 4 gruppi diversi: 1) un gruppo normale, 2) un gruppo formato da topi diabetici non trattati con insulina 3) un gruppo formato da topi diabetici trattati con insulina durante l'ultima settimana e 4) un gruppo trattato, durante l'ultima settimana, con insulina più acido alfa lipoico, una sostanza che blocca la produzione di radicali liberi. Anche nei topi, solo tre settimane di iperglicemia hanno indotto danni tissutali permanenti (retinopatia, nefropatia), che erano invece prevenuti dalla somministrazione di acido lipoico. L'insulina da sola non era in grado di annullare la memoria metabolica già instaurata [41]. Questa scoperta potrebbe cambiare l'approccio alla terapia del diabete; oggi, infatti, se un anziano è colpito da diabete di tipo 2, si consiglia di iniziare con la terapia dietetica e l'attività fisica prima di passare al trattamento farmacologico dell'iperglicemia. Tuttavia queste iniziative, pur efficaci, richiedono tempi molto lunghi che quindi non correggono il processo di memoria metabolica. Ora invece si sa che è necessario intervenire con i farmaci il prima possibile per abbassare al più presto la glicemia. Ancora non sappiamo dopo quanto tempo il danno metabolico si instaura nell'uomo ed è possibile che i tempi siano più lunghi che nel modello sperimentale nell'animale, ma è necessario valutarlo con precisione con ulteriori studi. Si stanno anche investigando nuove molecole che specificamente possano "staccare" le molecole di glucosio

dalle proteine dei mitocondri e che costituirebbero la migliore terapia per cancellare la memoria metabolica cellulare.

1.6 CITOFUORIMETRIA A FLUSSO:

La citofluorimetria a flusso è una tecnica di misurazione multiparametrica di caratteristiche fisiche e/o chimiche condotta su cellule in sospensione all'interno di un fluido di trasporto. Le cellule/particelle passano allineate attraverso un sistema di rilevazione ottico/elettronico.

Il tipo di parametri attualmente rilevabili in citofluorimetria a flusso è molto ampio: volume e complessità morfologica delle cellule, contenuto di pigmenti, DNA, RNA, proteine, antigeni di superficie ed intracellulari, pH, flussi di Ca^{++} , etc. Aspetto peculiare della citofluorimetria a flusso, strettamente connesso alla possibilità di analizzare contemporaneamente più fluorescenze, è quello di raccogliere e memorizzare molti parametri per ogni singola cellula analizzata, parametri che, correlati tra loro, permettono di individuare e studiare sottopopolazioni (anche rare) di cellule. Alcuni citofluorimetri sono inoltre in grado di separare fisicamente, secondo criteri stabiliti dall'utilizzatore, popolazioni cellulari raccogliendole sia in provette che su micropiastre.

1.6.1 Principi di base

All'interno della cella a flusso, in base al principio di **focalizzazione idrodinamica**, le particelle vengono messe in fila una dietro l'altra grazie alla differenza di pressione tra il campione e il fluido di trasporto (Fig. 5).

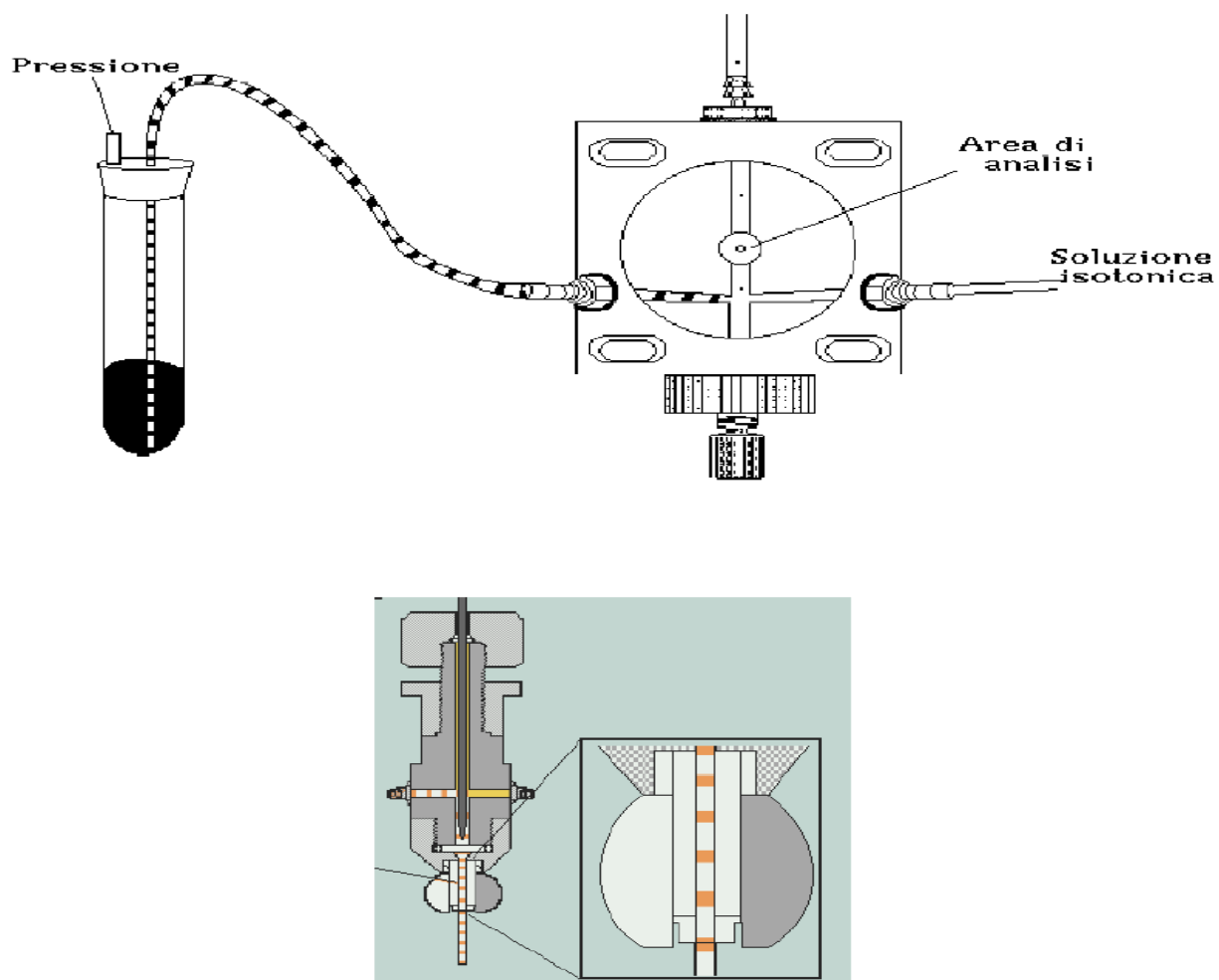


Fig.5: Struttura interna della cella di un citofluorimetro.

Le particelle così disposte passano davanti al **raggio laser** di forma ellittica, focalizzato in modo da colpire le cellule al centro del canale di conta formato dal fluido di trasporto.

Colpite dal laser le particelle emettono diversi segnali:

FS relativo alle dimensioni,

SS relativo alla granularità,

se le particelle sono marcate con una **sostanza fluorescente**, un colore, per identificare una certa popolazione.

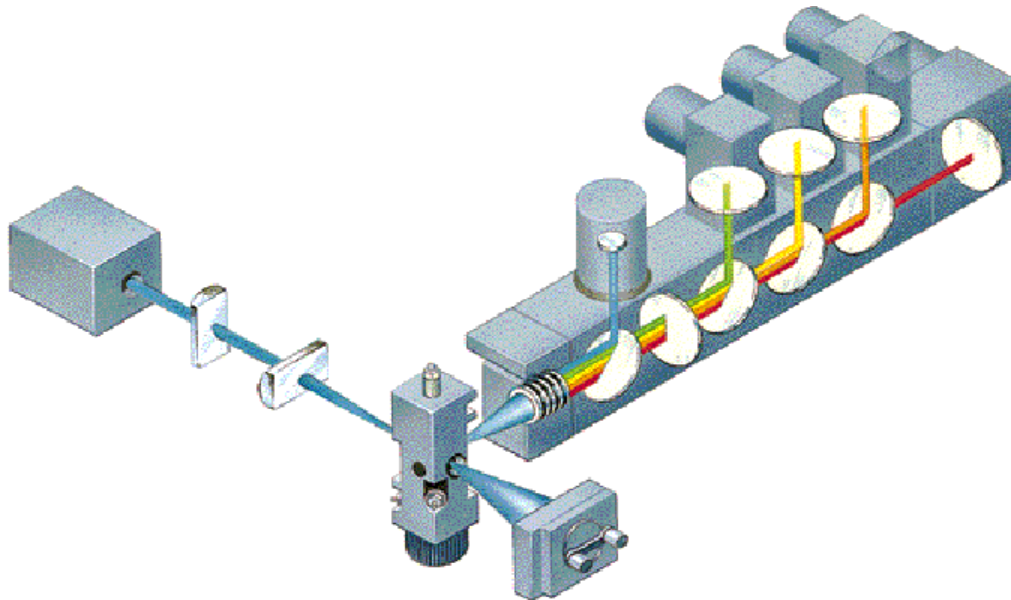


Fig. 6: Sistema di filtri ottici.

In caso di impiego di più di una sostanza fluorescente, le diverse emissioni di colore vengono separate attraverso un sistema di filtri ottici, in modo da poter analizzare separatamente tutte le diverse **fluorescenze (FL1,FL2,FL3,FL4)** (Fig.6).

I **fotomoltiplicatori (PMT)** trasformano i segnali luminosi in impulsi elettrici direttamente proporzionali alla luce raccolta (Fig.7).

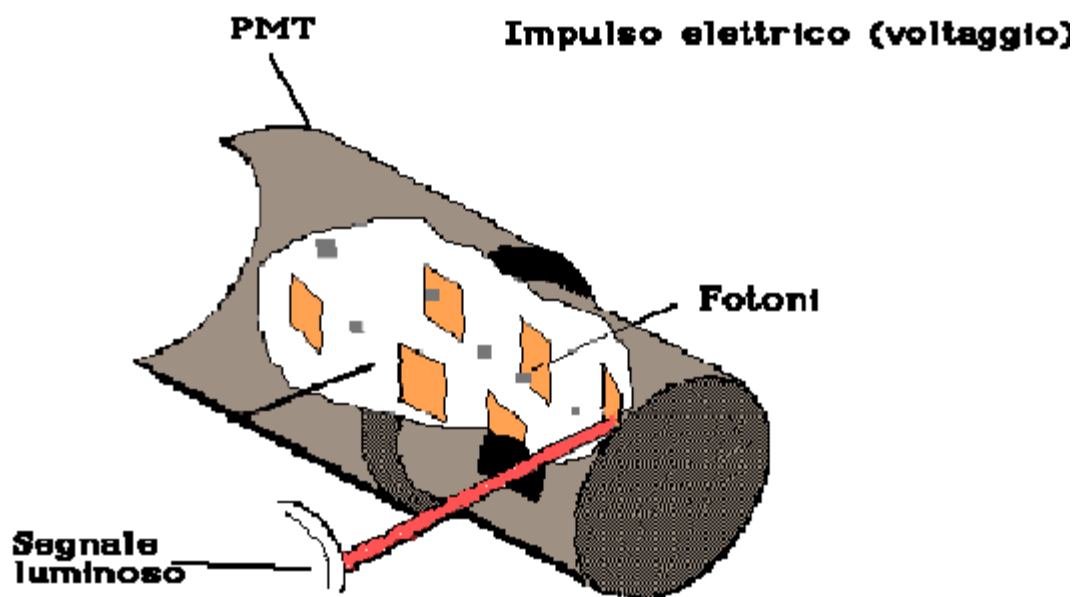


Fig.7: Fotomoltiplicatore.

L'ampiezza del segnale viene misurata in volts (da 0 a 10); per dare una visione grafica il voltaggio viene trasformato in canali di conta (da 0 a 1023). Questo passaggio viene definito come **conversione analogico-digitale** (Fig 8);

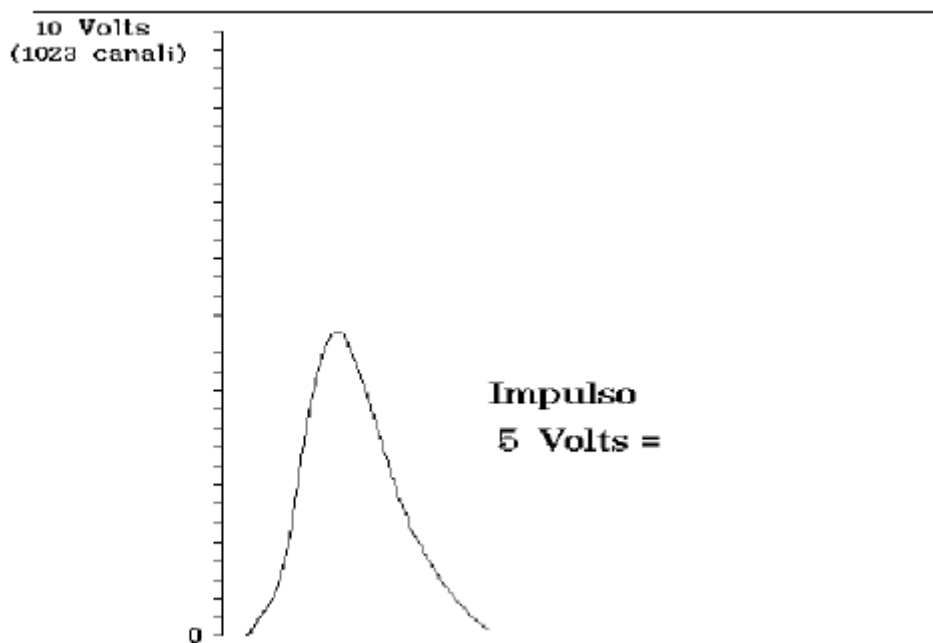


Fig.8: Conversione del segnale da volts a canali di conta.

gli impulsi convertiti incrementano la conta per ogni canale. Il diagramma delle conte rispetto ai canali fornisce l'**istogramma** (Fig.9).

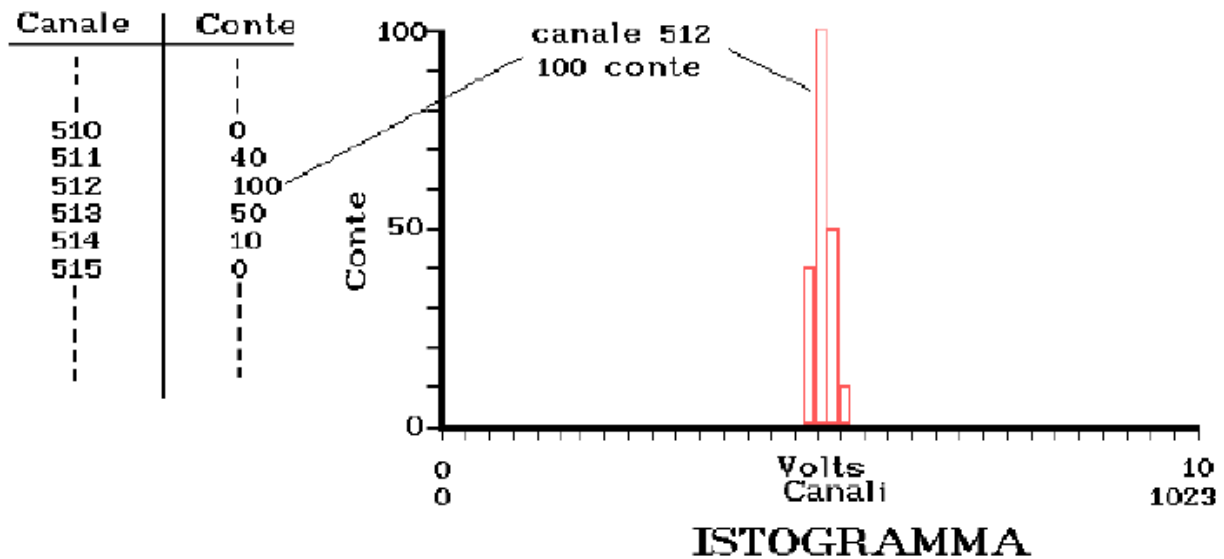


Fig.9: Istogramma derivato dalla conversione analogico-digitale.

L'istogramma può essere di tipo mono o biparametrico. Nel biparametrico due grandezze misurate sono simultaneamente visualizzate sull'asse delle ascisse e delle ordinate. L'asse Z riporta il valore delle conte (Fig 10).

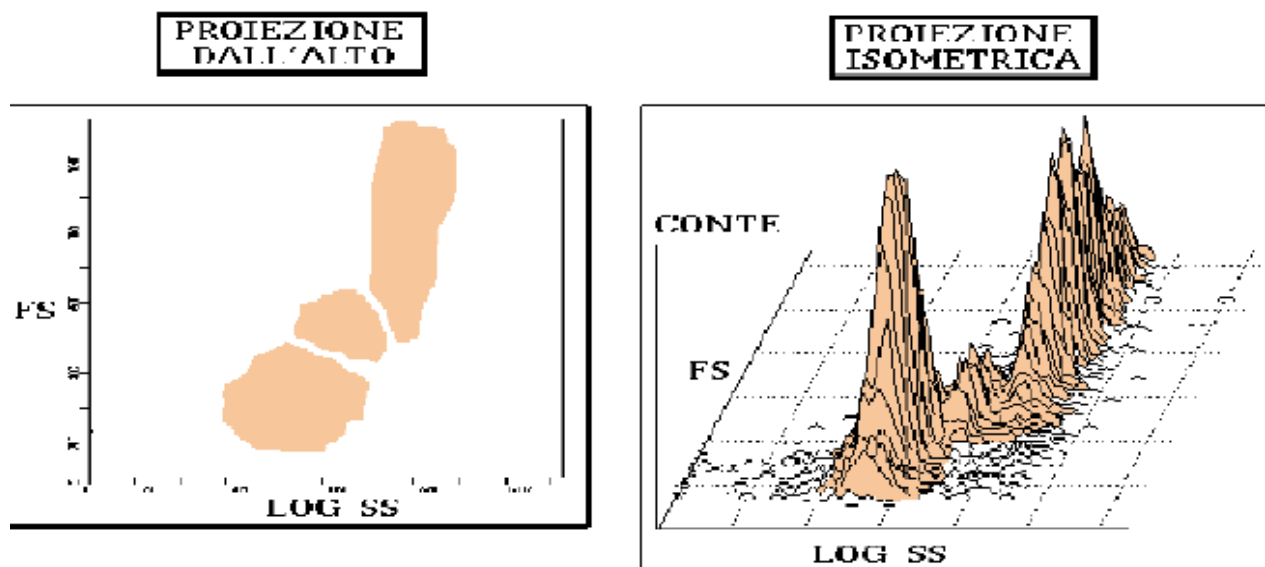


Fig.10: Proiezione mono e bi-parametrica dell'istogramma.

1.6.2 Sostanze fluorescenti

Le sostanze fluorescenti o marcatori, hanno la capacità di assorbire certe lunghezze d'onda quando vengo eccitate, e di emettere un'altra lunghezza d'onda diversa da quella di assorbimento.

Tra le sostanze più diffuse in citometria abbiamo i fluorocromi, con i quali vengono coniugati gli anticorpi monoclonali diretti contro antigeni di superficie in modo da poter identificare una determinata popolazione. Originariamente si lavorava prevalentemente con due fluorocromi, **FITC** (isoticianato di fluorescina) e **PE** (ficoeritrina) ai quali si sono aggiunti in tempi recenti i fluorocromi Tandem **ECD** (energy coupled dye) e **PC5** (ficoeritrina cianina).

I fluorocromi tandem si basano sul principio del trasferimento di energia da un fluorocromo all'altro attraverso un legame chimico.

Tutti questi fluorocromi vengono eccitati con un laser ad Argon con una lunghezza d'onda di 488nm.

Le rispettive emissioni sono:

FITC = 525 nm PC5 = 675nm

PE = 575nm ECD = 620nm

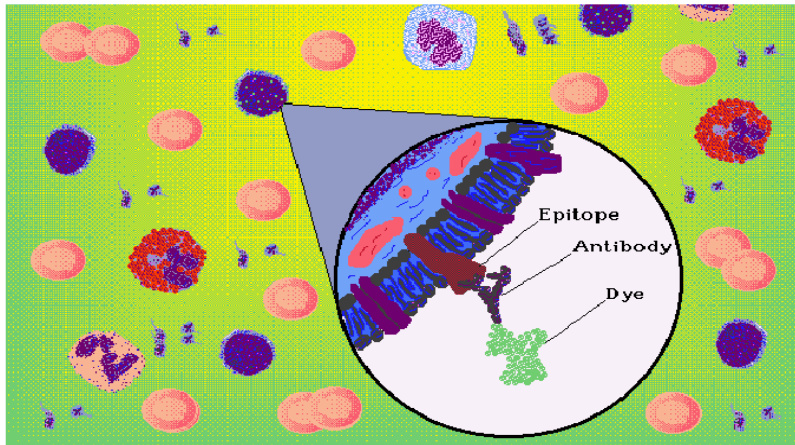


Fig.11: Ioduro di Propidio sostanza fluorescente per la marcatura del DNA.

Sono attualmente disponibili traccianti cellulari fluorescenti che permettono lo studio citofluorimetrico del potenziale di membrana mitocondriale su cellule viventi.

Le molecole fluorescenti usate come sonde per il potenziale di membrana mitocondriale dovrebbero trasportare una carica delocalizzata per poter penetrare la membrana mitocondriale e dovrebbero accumularsi all'interno del mitocondrio in accordo all'equazione di Nerst per il potenziale elettrochimico:

$$\Delta\Psi = (RT/ZF) \lg(C_i/C_0)$$

Dove:

R = costante ideale dei gas

T = temperatura assoluta

Z = carica dello ione

F = costante di Faraday

C_i = concentrazione all'interno della cellula

C_o = concentrazione all'esterno della cellula

C_o = concentrazione all'esterno della cellula

Durante l'apoptosi, la perdita del potenziale di membrana mitocondriale può essere misurata con il citofluorimetro e corrisponde ad una perdita nell'intensità della fluorescenza di sonde cationiche e lipofiliche, specifiche per i mitocondri.

Per monitorare le variazioni del $\Delta\Psi_m$ mitocondriale è possibile utilizzare un nuovo substrato voltaggio-sensibile e fluorescente come il JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide), che entra selettivamente nei mitocondri. Il JC-1 è caratterizzato da due picchi di emissione dopo eccitazione a 490nm: 520nm (FL₁) corrispondente alla forma monometrica del substrato, e 585 nm (FL₂), corrispondente alla forma aggregata del JC-1. In conseguenza a ciò, il colore del substrato cambia da verde a rosso, quando il substrato è presente in alte concentrazioni, oppure quando si ha un innalzamento del potenziale di membrana mitocondriale [42]. Il potenziale di membrana mitocondriale viene espresso come rapporto fra la fluorescenza rossa e quella verde, e la depolarizzazione mitocondriale viene indicata da un decremento nel rapporto tra le due fluorescenze. Essendo il JC-1 poco tossico per la cellula e discretamente solubile, si candida come sonda d'elezione nella marcatura dei mitocondri, fornendo un metodo di lettura del potenziale che è sia quantitativo che qualitativo. Il rapporto tra FL₂/FL₁ (come intensità di fluorescenza) è indipendente da fattori morfologici (dimensioni dei mitocondri,

forma, densità), che influenzano invece singoli componenti di altri segnali fluorescenti. Come controllo positivo interno è possibile usare agenti disaccoppianti come il CCCP (carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone), che permette di verificare il collasso del potenziale di membrana mitocondriale. Questo composto abolisce il collegamento fra la catena respiratoria e il sistema di fosforilazione che si osserva nei mitocondri intatti e distrugge il potenziale di membrana. In questo modo è possibile misurare la componente non- Nerstiana della fluorescenza, misurando la differenza dell'intensità fuori e dentro la cellula in condizioni di $\Delta\Psi$ mitocondriale = 0. Questa differenza espressa come $(F_i - F_o)$ riflette il legame interno del substrato fluorescente e la costante di legame K_b può essere ottenuta dal rapporto $(F_i - F_o) / F_o$. Questa costante può essere usata per determinare la componente Nerstiana della fluorescenza all'interno della cellula (dovuta alla componente libera del substrato) a valori di $\Delta\Psi$ mitocondriale = 0 [43].

Le tecniche citofluorimetriche per la stima e la misurazione del $\Delta\Psi_m$ richiedono sia un'attenta valutazione delle condizioni sperimentali ottimali (concentrazione delle cellule e dei reagenti usati, tempi di incubazione, controlli appropriati) per ottenere informazioni accurate. Infatti, i dati in letteratura confermano che l'uso del JC-1 si è dimostrato ideale con alcuni tipi cellulari e in alcune condizioni sperimentali al di fuori delle quali deve essere utilizzato con cautela. In caso di protocolli sperimentali che prevedano l'uso di acqua ossigenata, per esempio, la fluorescenza del JC-1 in forma aggregata può cambiare indipendentemente dal $\Delta\Psi_m$. Inoltre, poiché il tempo per avere l'equilibrio tra forma monomerica e forma aggregata è strettamente dipendente dal rapporto superficie-volume, il JC-1 non rappresenta la sonda ideale nel caso di cellule dove questo rapporto è molto variabile, come per esempio i neuroni. [44].

Le cellule ematiche, sono facilmente accessibili (basta un prelievo di sangue), la lettura al citofluorimetro è praticamente istantanea e le sottopopolazioni leucocitarie (granulociti, linfociti e monociti), possono essere analizzate con il citofluorimetro, mediante strategie di analisi e *gating*.

I polimorfonucleati sono dotati di un sistema mitocondriale intricato, importante per processi come la chemiotassi, l'apoptosi, la fagocitosi ecc.

Inizialmente, la lettura del potenziale di membrana mitocondriale prevedeva l'isolamento dei leucociti dal campione di sangue intero mediante metodiche convenzionali, come il Fycoll, troppo lunghe, dispendiose e difficilmente standardizzabili. Il campione di sangue intero invece, può essere semplicemente incubato con l'opportuno tracciante, sottoposto a lisi eritrocitaria con una soluzione di ammonio cloruro e poi immediatamente letto con il citofluorimetro per la misurazione del $\Delta\Psi_m$ leucocitario. La velocità della metodica su sangue intero rappresenta un fattore critico fondamentale per evitare alterazioni di parametri bioenergetici come il pH cellulare. La metodica prevede di diluire i neutrofili nella soluzione lisante che, pur essendo a base di ammonio, non altera significativamente il $\Delta\Psi$ mitocondriale e le proprietà fluorescenti del JC-1, che è stabile in un range di pH compreso tra 6.5 e 8.0 [45].

Per la rilevazione qualitativa della produzione di ROS, prodotti dall'attività della NADPH ossidasi, è possibile usare una sonda non fluorescente, la Dihydrorhodamine-123 (Molecular Probes Inc, Eugene, Or) (DHR). La DHR è un'ammina quaternaria permanentemente carica ed è accumulata in maniera selettiva in quei compartimenti cellulari dotati di elevata elettronegatività, quali quelli mitocondriali. In seguito all'attivazione da parte dei ROS, la DHR viene convertita in rhodamina-123 (Fig.12), esibendo fluorescenza verde. La misurazione della fluorescenza è una valutazione indiretta del burst ossidativo.

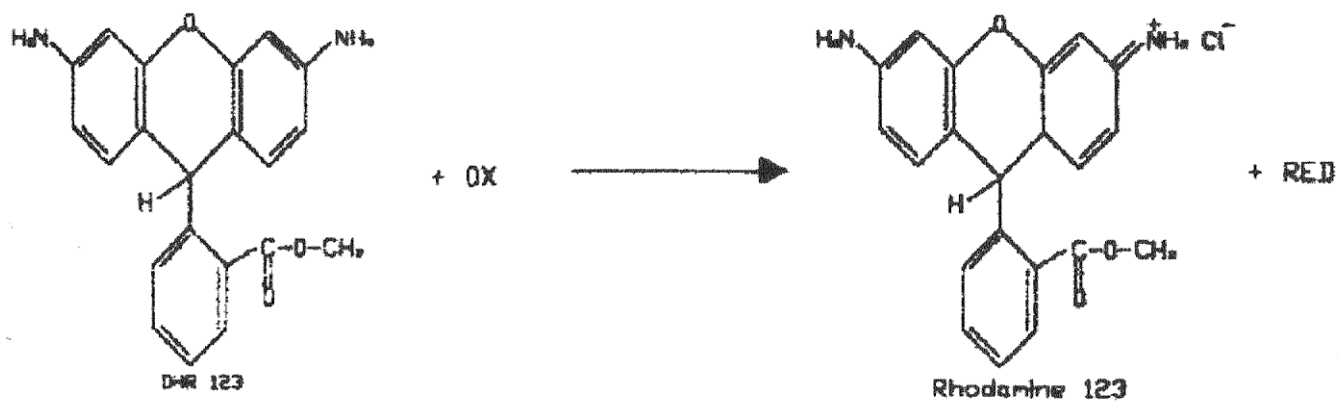


Fig.12: Ossidazione della diidrorodamina 123 a rodamina 123.

Come controllo positivo del burst ossidativo, è possibile usare il Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), un potente mitogeno, promotore tumorale e attivatore della proteina chinasi C [46].

2. SCOPO DELLA TESI:

Obiettivi della nostra ricerca sono stati: 1) misurare mediante il fluorocromo JC-1 il $\Delta\Psi_m$ di leucociti polimorfonucleati da pazienti diabetici tipo 1, loro fratelli non diabetici e soggetti di controllo; 2) misurazione della produzione di ROS, basale e stimolata dal PMA, nei tre gruppi di pazienti suddetti mediante la sonda DHR; 3) messa a punto della metodica per la misurazione del $\Delta\Psi_m$ in citometria a flusso e per la sua applicazione a cellule provenienti da colture cellulari in monostrato: fibroblasti, INS1-E e HUVEC.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Metodica di misurazione del $\Delta\Psi_m$ su cellule circolanti ex vivo:

Abbiamo studiato 20 pazienti con Diabete di tipo 1 (12 femmine), con durata della malattia pari a 23 anni \pm 15; 20 parenti non diabetici di soggetti con diabete di tipo 1 e 25 soggetti sani (16 femmine), senza anamnesi familiare per diabete di tipo 1.

Il gruppo dei pazienti diabetici includeva otto pazienti con retinopatia e un paziente con macroalbuminuria persistente. Nessuno di loro era sottoposto a trattamenti medici, tranne l'insulina ($0,6 \pm 0,2$ IU/kg) e, quando necessario, farmaci anti-ipertensivi (i pazienti ipertesi assumevano antagonisti dell'enzima convertitore dell'angiotensina e/o calcio-antagonisti).

Nessuno dei parenti o dei controlli presentava evidenze cliniche di malattia, e nessuno di essi assumeva farmaci. Tutti i soggetti avevano firmato il consenso informato per la commissione etica, e l'ospedale aveva approvato lo studio.

Di tutti i pazienti erano misurati il BMI (Body mass index, calcolato come peso corporeo/altezza² in Kg/m²), emocromo, glicemia, emoglobina glicata, creatininemia, trigliceridi, colesterolo totale, HDL, LDL, bilirubina, transaminasi, GGT e il rapporto tra albumina e creatinina urinarie. Le concentrazioni ematiche di insulina di fratelli e controlli sani, erano dosate mediante saggio radioimmunoenzimatico commerciale (Medgenix Diagnostic, Fleurus, Belgio). Il grado di sensibilità all'insulina è stato valutato mediante il metodo HOMA-IS (homeostasis model assessment of insulin sensitivity), dove $HOMA-IS = 1/HOMA-IR$. L'indice HOMA-IR è una formula matematica che permette di valutare la sensibilità all'insulina in funzione dei livelli circolanti a digiuno di glucosio e dell'insulina stessa:

$$HOMA-IR = \text{insulinemia (mU/L)} \times \text{glicemia (mg/dL)} / 405$$

oppure:

$$HOMA-IR = \text{insulinemia (}\mu\text{U/ml)} \times \text{glicemia (mmol/L)} / 22.5$$

a seconda delle unità di misura nelle quali sono espresse glicemia e insulinemia.

Tale indice è stato confermato un valido surrogato per la valutazione della sensibilità all'insulina in confronto con la tecnica del clamp euglicemico-iperinsulinemico in individui con vari gradi di tolleranza al glucosio e insulino-sensibilità [47].

Per quanto riguarda la fase sperimentale, 100 µl di sangue intero venivano incubati con 20 µmol/l di JC-1, per 15 minuti a 37°C in presenza o in assenza di 100 µmol/l di CCCP. Successivamente il sangue era sottoposto a lisi eritrocitaria (mediante aggiunta di 3 ml di soluzione lisante NH₄CL 155 mmol/l, KHCO₃ 10 mmol/l) e le cellule analizzate mediante FACScalibur (BD Biosciences, Milan, Italy) usando il programma di analisi dei dati CELL Quest. Erano così acquisite 10,000 cellule per campione ponendo il *gate* sui granulociti. La fluorescenza del JC-1 era espressa come rapporto FL₂/FL₁ e il ΔΨ mitocondriale espresso come: $[(FL_2/FL_1) - (FL_{2CCCP}/FL_{1CCCP})/(FL_2/FL_1)] \times 100$.

3.1.1 Produzione di ROS.

I livelli intracellulari dei ROS nei leucociti erano misurati usando la sonda DHR: 100 µl di sangue intero venivano incubati con 5 µmol/l di DHR per 15 minuti a 37°C in presenza o in assenza di 1 µmol/l di PMA. La fluorescenza della DHR veniva misurata su FL1. Questo risultato era espresso come rapporto tra l'intensità media della fluorescenza del canale delle cellule in condizioni basali e dopo stimolazione con PMA.

3.2 Incubazione dei neutrofili in sangue intero.

I leucociti presenti in 100 µl di sangue prelevato in EDTA da pazienti con diabete di tipo 1 e controlli sani venivano incubati a 37°C per un tempo compreso tra i 15 minuti e le 24 ore con concentrazioni di glucosio che variano tra 5 e 44 mmol/l e/o di insulina umana in concentrazioni variabili tra 10 e 192 µU/ml.

Trascorso questo tempo di incubazione, i campioni di sangue venivano incubati per 15 minuti a 37°C con 20 µmol/l di JC-1 con o senza CCCP e, successivamente, erano trattati con 3 ml di soluzione lisante dei globuli rossi e mantenuti in ghiaccio fino alla lettura citofluorimetrica. Con il FACScalibur erano acquisiti 10,000 eventi per campione usando il programma CELLQuest.

La fluorescenza del JC-1 veniva analizzata sui canali FL-1 e FL-2 per la determinazione del marcatore in forma monometrica o aggregata, rispettivamente.

3.2.1. Incubazioni con glucosio e/o Insulina

Glucosio stock 300 moli/L = 2.7 g in 50 µL PBS

20 µL (300 moli/L) + 10 µL PBS = 30 µL (200 moli/L)

10 µL (300 moli/L) + 20 µL PBS = 30 µL (100 moli/L)

BAS-5 mM = 90 mg/dL 100 µL sangue

11,1 mM = 200 mg/dL 100 µL sangue + 5 µL soluzione glucosio (134 mmoli/L)

22,2 mM = 400 mg/dL 100 µL sangue + 5 µL soluzione glucosio (375 mmoli/L)

44,4 mM = 800 mg/dL 100 µL sangue + 5 µL soluzione glucosio (859 mmoli/L)

Insulina stock 100 U/mL = 100000000 µU/mL

5 µL (100000000 µU/mL) + 4995 µL PBS = 5000 µL (100000 µU/mL)

5 µL (100000 µU/mL) + 120 µL PBS = 125 µL (4000 µU/mL)

20 µL (4000 µU/mL) + 20 µL PBS = 40 µL (2000 µU/mL)

20 µL (2000 µU/mL) + 20 µL PBS = 40 µL (1000 µU/mL)

BAS-10 µU/mL = 100 mL sangue

55 µU/mL = 100 mL sangue + 5 µL (1000 µU/mL)

101 µU/mL = 100 mL sangue + 5 µL (2000 µU/mL)

192 µU/mL = 100 mL sangue + 5 µL (4000 µU/mL)

Pre-incubazioni di 15, 30, 60, 180 minuti a 37°C

Provette	Sangue	Glucosio	PBS
G5 mM x 2	100 µL	5 µL PBS	5 µL
G11,1 mM x2	100 µL	5 µL 134 mmoli/L	5 µL
G 22,2 mM x 2	100 µL	5 µL 375 mmoli/L	5 µL
G44,4 mM x 2	100 µL	5 µL 859 mmoli/L	5 µL

Provette	Sangue	PBS	Insulina
I-10 x 2	100 µL	5 µL	5 µL PBS
I-55 x2	100 µL	5 µL	5 µL 1 U/mL
I-101 x 2	100 µL	5 µL	5 µL 2 U/mL
I-192 x 2	100 µL	5 µL PBS	5 µL 4 U/mL

Provette	Sangue	Glucosio	Insulina
G5 mM x 2	100 µL	5 µL PBS	5 µL PBS
G11,1 mM x2	100 µL	5 µL 134 mmoli/L	5 µL 1 U/ml
G 22,2 mM x 2	100 µL	5 µL 375 mmoli/L	5 µL 2 U/ml
G44,4 mM x 2	100 µL	5 µL 859 mmoli/L	5 µL 3 U/ml

3.3 Metodica di misurazione del $\Delta\Psi_m$ su culture cellulari

La manipolazione delle colture cellulari in vitro veniva effettuata in condizioni di sterilità: tutte le operazioni venivano svolte sotto una cappa a flusso laminare, la vetreria e i ferri utilizzati erano sterilizzati in autoclave a vapore (pressione di 1Kg/cm² per 120 minuti).

3.3.1 Fibroblasti

I fibroblasti sono stati isolati dalla cute di donatori. La cute, una volta raccolta, veniva tritata e digerita per due ore a 37°C in una soluzione allo 0,20% di collagenasi I sciolta in Dulbecco's modified Eagle's medium privo di siero. Le cellule così separate erano centrifugate e risospese in un terreno di coltura costituito dal Dulbecco's modified Eagle's medium con aggiunta del 10% di siero fetale bovino e l'1% di antibiotici e antimicotici. Le cellule crescevano a 37°C con il 100% di umidità in atmosfera al 5% di CO₂ [48]. Gli esperimenti sono stati condotti usando cellule non più avanti del terzo passaggio, sottoposte ad incubazioni di due ore con il glucosio (fino ad un massimo di 20mmol/l). Dopo questo periodo di incubazione le cellule venivano staccate e risospese in 1 ml di PBS. Della sospensione cellulare, 100 µl erano incubati con 20 µmol/l di JC-1 per 15 minuti a 37°C con e senza CCCP. Successivamente la sospensione cellulare viene diluita in 600µl di PBS e sottoposta alla lettura con FACScalibur.

3.4 *INSI-E*:

La linea clonale di cellule β , INS-1E è stata selezionata per il suo contenuto di insulina e per l'adeguata proliferazione cellulare.

Le cellule sono state coltivate in atmosfera umidificata al 5% di CO_2 , in terreno completo composto da RPMI 1640 arricchito con il 10% di siero fetale bovino, 1mM di sodio piruvato, 50 $\mu\text{mol/l}$ di 2-mercaptoetanolo, 2 mmol/l di glutamina, 10 mmol/l di Hepes, 100 U/ml di penicillina e 100 $\mu\text{g/ml}$ di streptomicina, e piastrate ad una densità di 4×10^4 cellule / cm^2 in fiasca da 75 cm^2 .

Per esaminare le cellule in coltura, ad ogni passaggio ed in seguito ad eventuali trattamenti, veniva utilizzato un microscopio ottico invertito a contrasto di fase "Zeiss Televar 3"(Fig.13)

Per gli esperimenti le cellule venivano trasferite ad una densità di 2×10^5 cellule /1ml in piastre da 24 pozzetti . Le cellule venivano mantenute per due ore con glucosio 2,5 mmol/l e poi trattate con JC-1 per 15 minuti a 37°C in KRBH (Krebs-Ringer bicarbonate HEPES buffer) . Lo stimolo del glucosio (in concentrazioni di 7,5 mmol/l e 20,0 mmol/l era prolungato per un periodo di 10 minuti, aumentando la concentrazione a partire da quella più bassa di 2,5 mmol/l. Passati i 10 minuti, si procedeva alla depolarizzazione con CCCP [49].

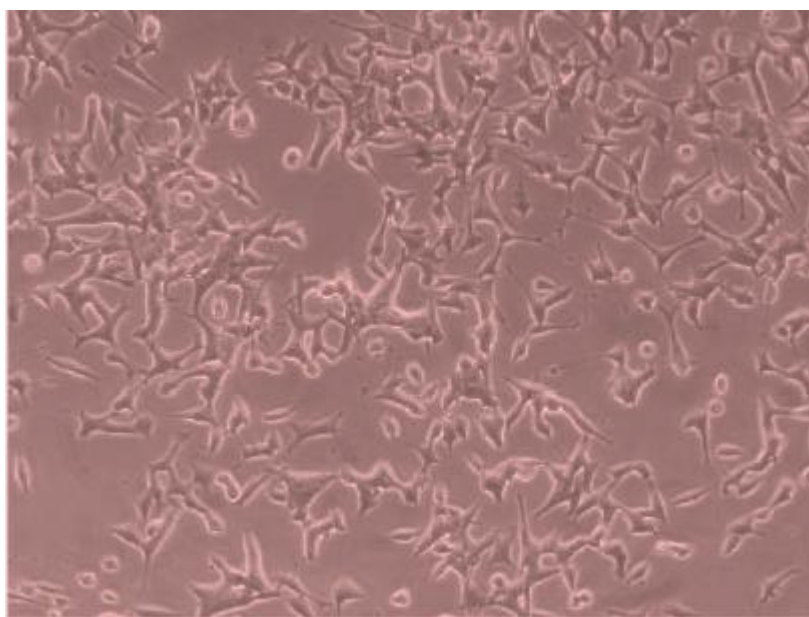


Fig.13: INS-1E fotografate con microscopio ottico invertito a contrasto di fase Zeiss Televar 3.

3.5 HUVEC:

La metodica seguita per la procedura di isolamento delle cellule endoteliali dal cordone ombelicale umano (HUVEC: “human umbelical vein endothelial cell”) è quella descritta da Jaffe et al. (1973) [50], con alcune modifiche.

3.5.1 Terreno di coltura

Il terreno di coltura era preparato utilizzando 400 ml di M199 (Sigma, Milano, Italia) a cui erano aggiunti: 2,5 ml di soluzione di penicillina/streptomicina 5000 UI/ml, 10000 µg/ml (concentrazioni finali 25 UI/ml, 50 µg/ml) (Sigma), 5 ml di glutammina 200 mM (Sigma) (2 mM finale), 5 ml Hepes 1M (Sigma) (10 mM finale), 1,2 ml di eparina sodica 2100 UI/ml (5 UI/ml finale) (Roche), 100 ml di siero fetale bovino (FCS) scomplementato a 56 °C per 1h (Sigma) (20% finale) e 5 ml di fattore di crescita ottenuto da retina bovina (RDGF, 1% finale).

3.5.2. Trattamento delle fiasche e delle piastre per la cultura delle HUVEC

Le superfici per la coltura delle Huvec (fiasche e piastre Petri) erano trattate con gelatina (tipo B di pelle di maiale, SIGMA) al 2% (sciolta in acqua) per 15 minuti in incubatore a 37 °C. L'eccesso di gelatina era eliminato dalle fiasche e dai pozzetti che a questo punto potevano essere utilizzati per le colture di cellule endoteliali.

3.5.3. Preparazione dell'RDGF (retinal derived growth factor)

Per la preparazione dell'RDGF è stata seguita la metodica descritta nel protocollo di Bianchi et al. (1995).

Gli occhi di bue, prelevati presso i macelli pubblici, si conservano in soluzione di PBS 1X a freddo fino a quando non verrà effettuato l'isolamento del fattore di crescita. Da ogni occhio viene prelevato l'epitelio pigmentato e la retina che vengono trasferiti in un tubo da centrifuga, contenente PBS 1X freddo (mantenuto in ghiaccio) (1ml PBS/occhio).

La soluzione di PBS 1X contenente retine ed epitelii pigmentati viene incubata in ghiaccio per 30 minuti. Quindi viene centrifugata a 1000 rpm per 10 minuti a 4 °C. Il sovranatante viene raccolto e nuovamente centrifugato a 15000 rpm (JA 20, Beckman) per 20 minuti a 4 °C. Il sovranatante, raccolto dalla seconda centrifugazione, contenente il fattore di crescita, viene filtrato usando dei filtri per siringa da 0,8 µm e successivamente da 0,2 µm. Con il filtrato vengono preparate aliquote da 5ml conservate a -20°C.

3.5.4 Allestimento della coltura primaria (P0)

I cordoni ombelicali venivano raccolti in modo asettico al momento della nascita in sala parto e posti in appositi recipienti contenenti soluzione fisiologica (NaCl 0,9 %) (Farmacia Milano, Italia), penicillina 50 UI/ml e streptomycin 50 µg/ml (Sigma).

Il cordone ombelicale, veniva conservato a 4°C, utilizzato entro 24 h dal parto e sottoposto a ripetuti lavaggi su piastra Petri con soluzione fisiologica per eliminare eventuali coaguli di sangue. La vena ombelicale, riconoscibile dalle due arterie per le dimensioni del lume, veniva incannulata con una Scalp Vein Set 18G (Ethicon, Roma) ; la cannula era fermata con una pinza emostatica.

Dopo incannulazione la vena era lavata con soluzione fisiologica allo scopo di rimuovere i residui tromboematici; successivamente per eliminare la soluzione dal lume della vena, era iniettata una siringa d'aria. Quindi l'estremità libera del cordone veniva chiusa utilizzando una seconda pinza emostatica; erano iniettati lentamente nel lume della vena 10 ml di collagenasi tipo IA 0,1% (Sigma) in PBS 1X (Sigma) contenente CaCl_2 0,133 g/l e MgCl_2 0,100 g/l; la cannula era chiusa e il cordone ombelicale viene incubato a 37°C per 20'. Dopo i 20 minuti di incubazione era aperta l'estremità del cordone non incannulato ed erano iniettati attraverso la cannula 10 ml di terreno di coltura e il contenuto della vena viene raccolto all'interno di un tubo da centrifuga da 50 ml.

Quindi la sospensione cellulare veniva centrifugata a $100 \times g$ per 10 minuti a temperatura ambiente. Il sovranatante era eliminato ed il pellet risospeso in 4,5 ml di terreno di coltura. Le cellule (Passaggio: P0) venivano seminate in fiasche T25 precedentemente gelatinate.

Le cellule erano poste in incubatore a 37°C, in condizioni di atmosfera umidificata e 5% di CO_2 . A 24 h dall'allestimento della coltura, le cellule adese alla fiasca venivano sottoposte a 2-3 lavaggi con PBS 1X (Sigma) per rimuovere gli eritrociti in sospensione. Il terreno di coltura era rinnovato ogni 2-3 giorni.

Raggiunto l'80-90% della confluenza le cellule erano nuovamente tripsinizzate e seminate con diluizione 1:3. Per i nostri esperimenti le HUVEC, derivate da almeno 3 cordoni, venivano utilizzate, al massimo, entro il quarto passaggio (Passaggio P4).

Le cellule endoteliali a confluenza, su monostrato, mostravano un aspetto poligonale con alcune propaggini, comunemente indicate con il termine "cobblestone" (Fig.14). L'identificazione delle cellule endoteliali è stata confermata anche mediante la valutazione della presenza dell'antigene associato al fattore VIII o fattore di Von Willebrand (Jaffe et al. 1973). L'analisi fenotipica viene svolta marcando le HUVEC non aderenti con un anticorpo monoclonale di coniglio anti-fattore di von Willebrand (Sigma) e utilizzando un anticorpo secondario di capra anti-IgG di coniglio (H+L) coniugato con la rodamina (Zymed, San Francisco, CA).

3.5.5 Conservazione delle HUVEC

Congelamento:

Le cellule endoteliali a subconfluenza venivano trattate con tripsina, come descritto per il passaggio delle colture cellulari. Il pellet, ottenuto dalla centrifugazione, veniva risospeso in una soluzione fredda di congelamento, contenente 10% DMSO e 90% di terreno di coltura (v/v), ad una densità cellulare di 10^6 – 10^7 cellule/ml.

Le cellule sono state congelate lentamente: la velocità di raffreddamento ottimale era di 1-3 °C al minuto; la sospensione cellulare veniva trasferita in una provetta criogenica (Nalgene) lasciata per 24 h a –80 °C in un opportuno contenitore ad isopropanolo (cryostep) per lenta refrigerazione (1 °C/minuto) e poi trasferita in azoto liquido.

Scongelamento:

Le cellule dovevano essere scongelate rapidamente; le provette criogeniche contenenti le cellule congelate venivano prelevate dall'azoto liquido e immediatamente incubate in un bagno termostato a 37 °C.

Le cellule erano quindi trasferite in un tubo da centrifuga e, dopo aver aggiunto lentamente qualche ml di terreno, venivano centrifugate a 100 x g per 10 minuti a temperatura ambiente. Il pellet era risospeso nell'adatta quantità di terreno (4,5 ml per una fiasca T25, 10 ml per una T75, 23 ml per T175, 100 µl per ogni pozzetto e 2,5 ml per piastre Petri da 3,5 cm di diametro) le cellule seminate vengono incubate a 37 °C e a 5% di CO₂.

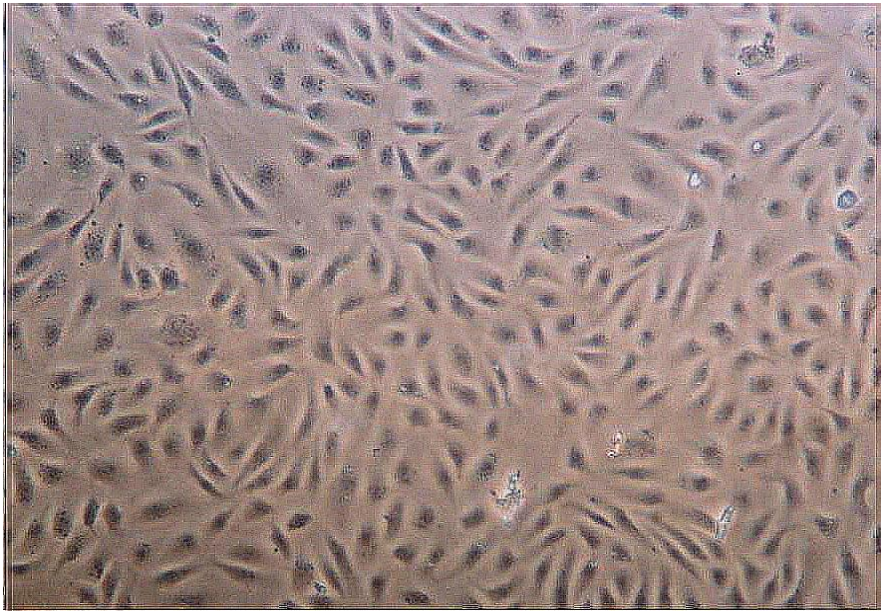


Fig 14: Huvec in monostrato a confluenza. Immagine ottenuta con il microscopio a contrasto di fase Zeiss Televar 3.

3.6. Microscopio a contrasto di fase:

Per esaminare le cellule in coltura, ad ogni passaggio ed in seguito ad eventuali trattamenti, viene utilizzato un microscopio ottico invertito a contrasto di fase “Zeiss Televar 3”. Il microscopio invertito è indicato per le osservazioni di campioni entro ogni tipo di contenitore per colture cellulari (fiasche, piastre a pozzetti, ecc.).

Il microscopio è corredato di illuminazione alogena 6V 25W, ideale per i metodi di contrasto usati nella microscopia rovesciata, e di un alimentatore incorporato nello stativo; inoltre la luminosità può essere regolata in continuo.

Il condensatore per contrasto di fase è posizionato a lunga distanza di lavoro ed è in grado di consentire l’osservazione in contenitori di alto spessore tipo fiasche, ecc.

Il microscopio è munito di tre tipi di obbiettivi: obiettivo acromatico 5X/0,12 INF, 10X/0,25 INF, 20X/0,45 INF.

L'obiettivo acromatico 10X/0,25 INF viene utilizzato per eseguire le fotografie delle cellule in coltura, trattate e non; a tale scopo, il microscopio è corredato di fotocamera reflex Nikon F90, in metodo manuale.

3.7. Analisi statistica:

L'analisi statistica è stata eseguita mediante il test t di Student, l'analisi della varianza e la regressione lineare semplice e multipla (software program Aabel 3, Gigawiz Ltd. Co). I dati sono espressi come media \pm DS.

4. RISULTATI

4.1. Misurazione del $\Delta\Psi_m$ su cellule circolanti ex vivo da pazienti diabetici, loro fratelli e controlli sani:

Dal punto di vista biochimico, i pazienti con diabete di tipo 1 differivano dai parenti e dai controlli sani nei valori di glicemia e di HbA1c più elevati, così come nei minori livelli di trigliceridi ($0,7\pm0,2$ mmol/l nei diabetici vs $1,0\pm0,4$ negli altri due gruppi, $P<0,05$).

I parenti dei pazienti diabetici differivano dal gruppo di controllo per una maggiore glicemia a digiuno (Tabella 2) e per livelli HbA1c più bassi; il valore del HOMA-IS era significativamente più basso nei parenti rispetto al gruppo di controllo ($0,48\pm0,20$ vs. $0,70\pm0,43$, $P<0,05$). Gli altri parametri biochimici non erano significativamente differenti nei tre gruppi (dati non mostrati).

Come mostrato nella tabella 2, il $\Delta\Psi_m$, dei polimorfonucleati circolanti (PMNs) era significativamente più alto nei diabetici ($68,1\pm15,4$ %, $P<0,01$) e nei parenti ($64,8\pm14,0$ %, $P<0,05$) rispetto ai controlli sani ($54,9\pm13,3$ %).

Complessivamente, nella popolazione studiata, il $\Delta\Psi_m$ dei leucociti era positivamente correlato solo con la glicemia ($r = 0,30$, coefficiente = $1,35$, errore standard = $0,55$, $P = 0,017$; Fig 15).

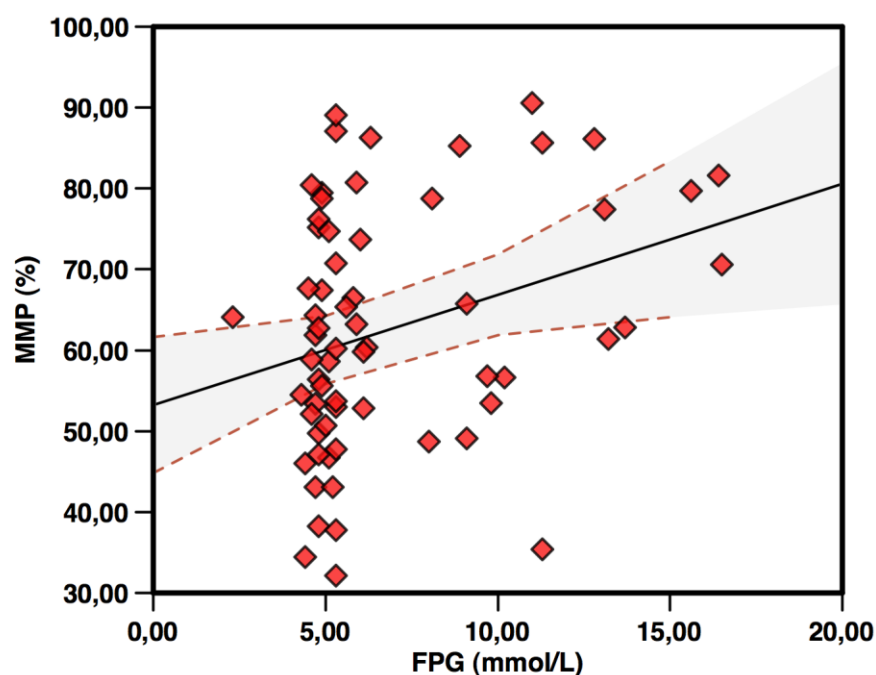


Fig.15: Correlazione tra il $\Delta\Psi_m$ (o potenziale di membrana mitocondriale, MMP) dei leucociti con i valori di glicemia a digiuno nei tre gruppi di pazienti studiati.

La fluorescenza leucocitaria basale della sonda DHR, la quale aumenta proporzionalmente con la quota intracellulare di composti ossidati, ha dato risultati simili nei tre gruppi studiati (Tab.2). Al contrario, il burst ossidativo nelle cellule isolate dai fratelli non diabetici in risposta all'agente stimolante PMA, era più basso rispetto ai controlli sani (Tab.2).

Nell'analisi delle correlazioni bivariate, il burst ossidativo era negativamente associato con gli anni trascorsi dalla prima diagnosi, nei pazienti diabetici ($r = -0,48$, coefficiente = $-14,94$, errore standard = $6,47$, $P < 0,05$); nell'intero gruppo di studio, il burst ossidativo correlava positivamente con il $\Delta\Psi_m$ ($r = 0,34$, coefficiente = $9,17$, errore standard = $3,17$, $P < 0,01$).

Tab.2 Caratteristiche cliniche e biochimiche dei partecipanti allo studio:

Parametro	Gruppo di controllo	Pazienti T1D	Fratelli
Età (anni)	46±12	45±11	45±11
BMI (kg/m ²)	24±3	25±4	26±5 **
Glicemia (mmol/l)	4,9±0,4	10,6±3,7¶	5,2±0,5 **#
Neutrofili (x10 ⁹ /l)	3,66±0,99	3,68±1,49	3,95±1,17
HbA1c (%)	5,3±0,3	8,7±1,3¶	5,1±0,3 **#
ΔΨm (%)	54,9±13,3	68,1±15,4 *	64,8±14,0 **
MFI granulociti	6,2±1,4	7,0±1,8	7,2±2,3
MFI granulociti stimolati con PMA	872±378	888±472	617±303 **, †

I dati sono espressi come media ± DS. ** $P < 0,05$, * $P < 0,01$, ¶ $P < 0,001$, confrontando i diabetici con i parenti e i controlli sani; † $P < 0,005$, # $P < 0,001$ confrontando i parenti con i diabetici.

BMI indice di massa corporea; ΔΨm potenziale di membrana mitocondriale; MFI intensità media di fluorescenza data dalla produzione di ROS nei granulociti a riposo e dopo stimolazione con PMA.

4.2 Neutrofili incubati in vitro:

La Figura 16 mostra i risultati ottenuti incubando i leucociti per 15 minuti a 37°C con concentrazioni crescenti di glucosio.

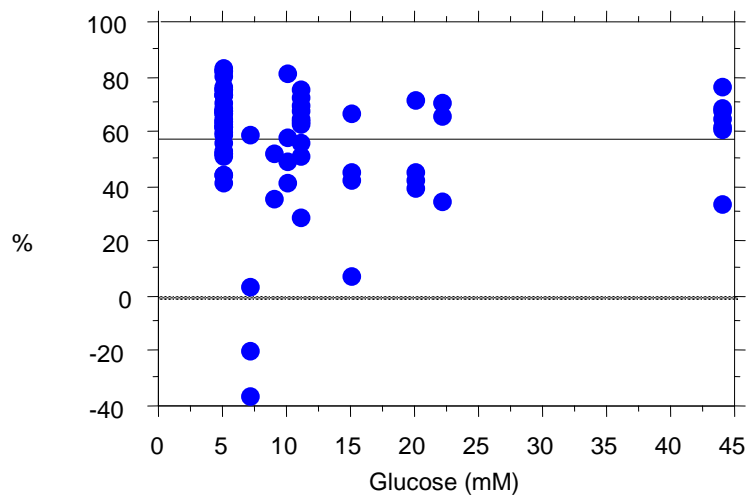


Fig.16: Regressione lineare del $\Delta\Psi\%$ $([(JC) - (JC+CCCP)]/(JC)) \times 100$ leucocitario vs glucosio (mmoli/L).

La Figura 17 mostra i risultati ottenuti incubando i leucociti per 15 minuti a 37°C con concentrazioni crescenti di insulina umana

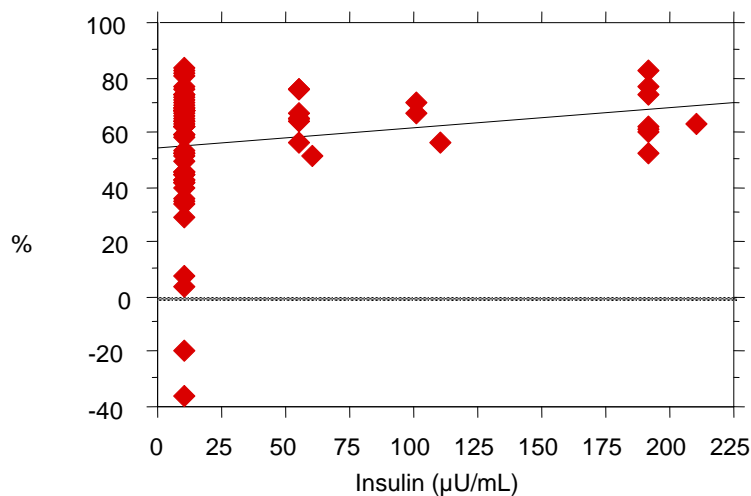


Fig 17 : Regressione lineare del $\Delta\Psi\%$ $([(JC) - (JC+CCCP)]/(JC)) \times 100$ leucocitario vs insulina (μU/mL).

La concentrazione di insulina nel sangue potrebbe avere un'azione stimolante sul potenziale di membrana. Infatti, la regressione lineare mostra un valore di $r = 0.2$ ($p = 0,085$), ma probabilmente occorrono tempi più lunghi di incubazione per raggiungere la significatività statistica.

Incubazioni a 37°C, prolungate fino a 24 ore, del campione di sangue intero non sono risultate attuabili perché si assiste alla progressiva depolarizzazione mitocondriale, presumibilmente in relazione all'esaurimento delle scorte metaboliche (glucosio) da parte della preponderante massa eritrocitaria (Fig.18).

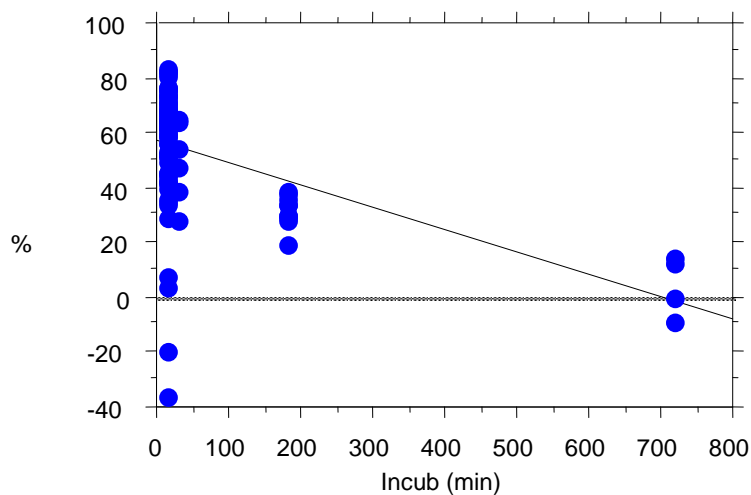


Fig 18: Decremento del $\Delta\Psi\%$ $\left(\frac{[(JC) - (JC+CCCP)]}{(JC)} \times 100\right)$ leucocitario in funzione del tempo di incubazione indipendentemente dalla presenza di varie concentrazioni di glucosio e/o insulina

4.3 Misurazione del $\Delta\Psi_m$ su colture cellulari:

4.3.1 Fibroblasti:

La metodica con il citofluorimetro e il JC-1 si è rivelata ancora una volta eccellente per verificare la vitalità cellulare ed escludere le cellule in apoptosi. I fibroblasti però presentano come caratteristica di base un grado elevato di grande adesività, per cui durante la lettura con il citofluorimetro si rilevano due popolazioni di cellule (singoletti e doppietti). Il citofluorimetro però, ci permette di fare delle letture su gate mirati in modo da misurare solo l'emissione di fluorescenza dei singoletti e non dei doppietti (falsamente alterata) (Fig.19)

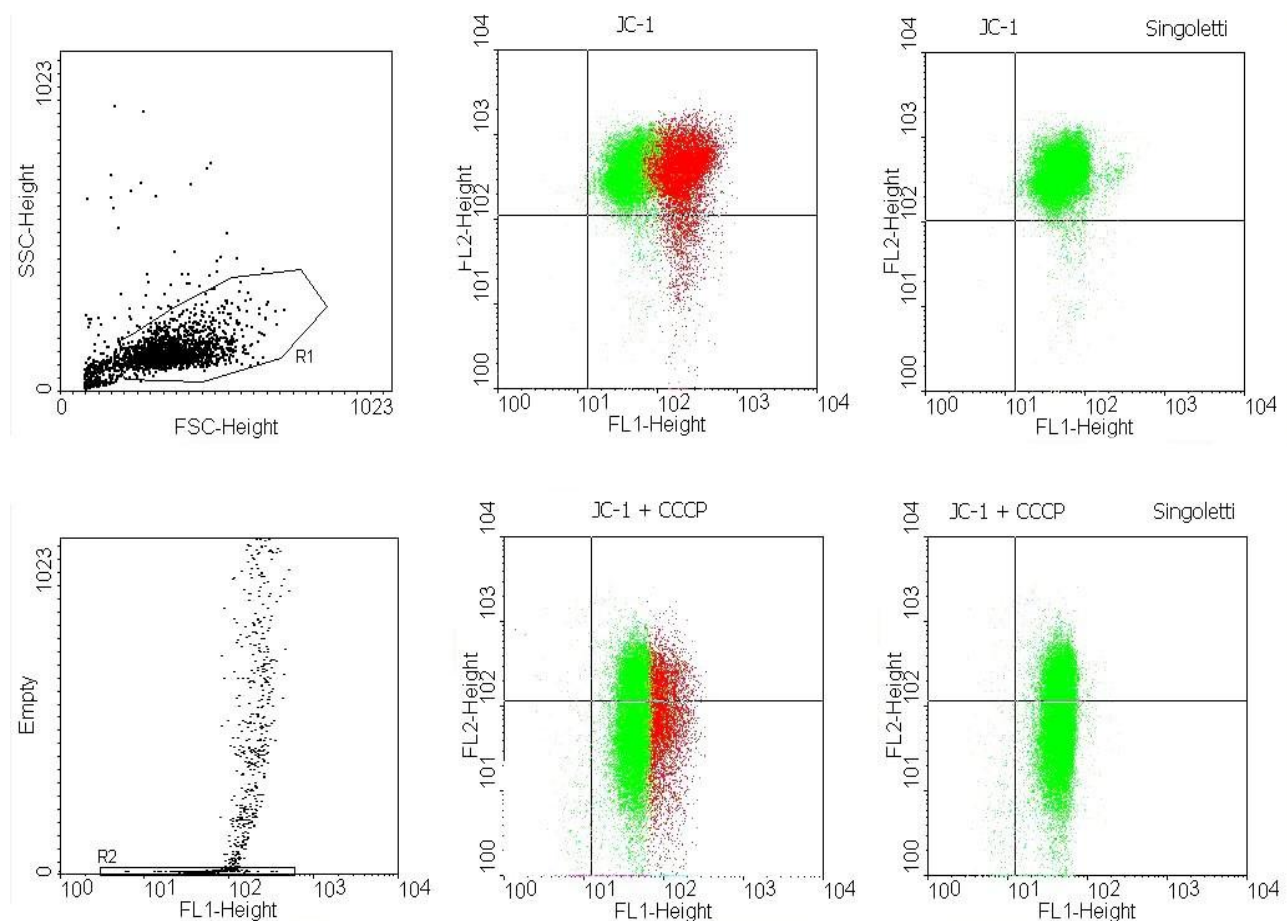


Fig.19: Fibroblasti non trattati con glucosio: lettura con doppietti e singoletti. Nella prima parte in si vede che sono stati considerati tutti gli eventi, senza discriminare tra cellule attaccate e non. Il risultato è un dot-plot in cui abbiamo (sia nel caso dell'incubazione con JC-1, sia nel caso di incubazione con JC-1 + CCCP) una doppia popolazione colorata in rosso e in verde per evidenziare le cellule singole (verdi) da quelle attaccate (rosse). Per ovviare a questo inconveniente è stato sufficiente considerare (figura in basso a sinistra) l'area sottesa dal picco di emissione (nel dot-plot viene chiamata Empty) in funzione dell'altezza del picco stesso

(FL1-Height). Questo ci ha permesso di considerare il gate R2 che circonda la parte bassa della nube, dove si posizionano i singoletti, mentre se dal basso ci spostiamo verso l'alto troviamo doppiette, triplete ecc. Il risultato (a destra) è un dot-plot in cui ho solo una popolazione cellulare, quella colorata in verde.

L'incubazione fino a 24 ore dei fibroblasti e con il glucosio in concentrazione di 20 mmol/l non sembra alterare in maniera specifica la vitalità di queste cellule. Fig 20.

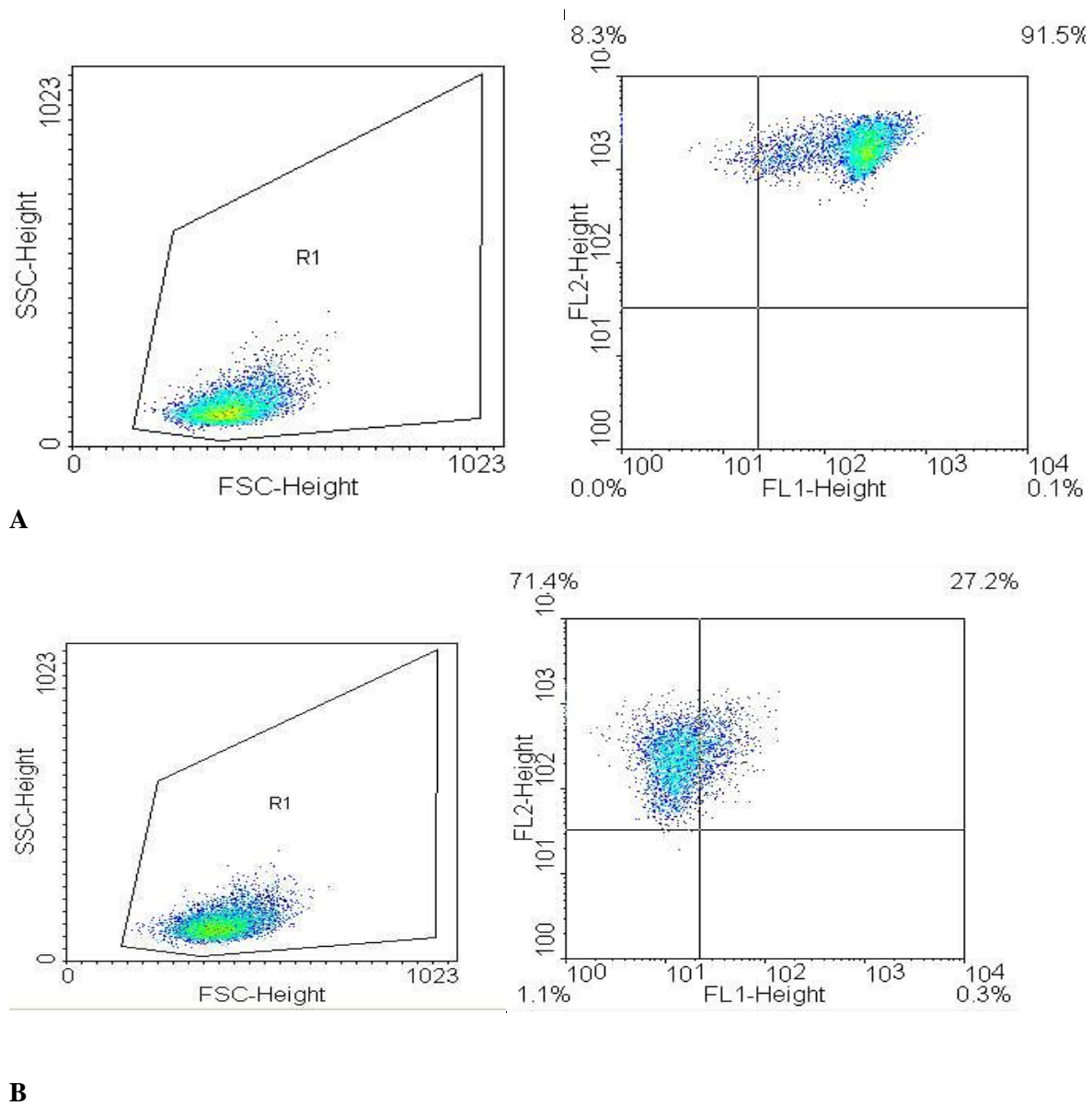


Fig 20: Fibroblasti incubati con glucosio e trattati con JC-1 (A) e con JC-1 + CCCP (B).

4.3.2 INS-1E:

Il metabolismo mitocondriale facilita l'attivazione della catena di trasporto degli elettroni la quale risulta in un'iperpolarizzazione della membrana mitocondriale che è pre-requisito per la generazione di ATP. Il potenziale misurato nelle cellule incubate con il JC-1 dimostra che il glucosio induce un'iperpolarizzazione, con un effetto massimo raggiunto quando la concentrazione di glucosio è 7,5mmol/l. Ulteriori aggiunte di glucosio non determinano una maggiore iperpolarizzazione. Come ci aspettavamo, anche in questo caso il CCCP depolarizza rapidamente il $\Delta\Psi$ mitocondriale. (Fig 21-22).

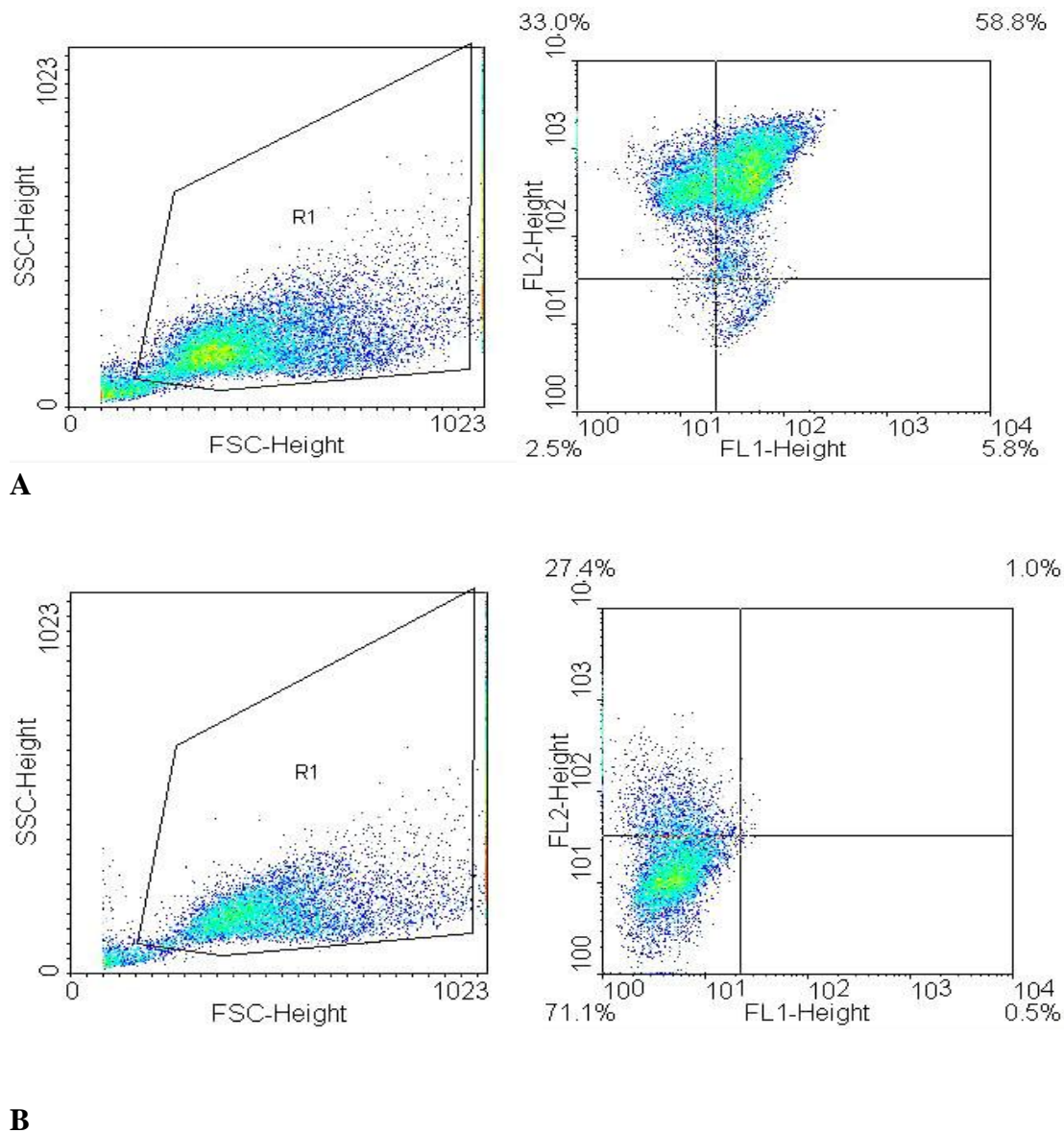


Fig 21: INS-1E trattate solo con JC-1(A) o con JC-1+ CCCP (B).

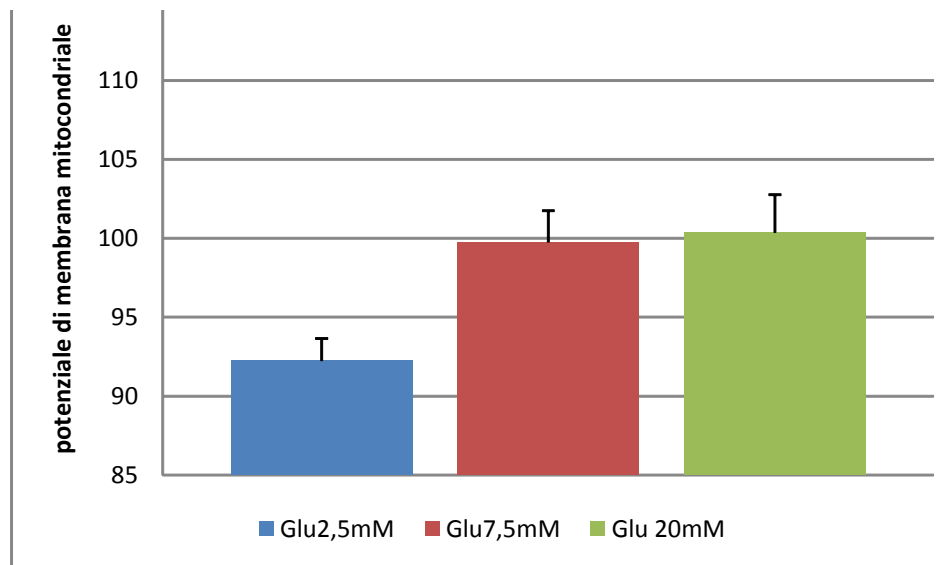


Fig.22: I valori di $\Delta\Psi$ mitocondriale calcolati secondo la formula: $[(FL_2/FL_1) - (FL_{2CCCP}/FL_{1CCCP})/(FL_2/FL_1)] \times 100$ per le cellule trattate con Glu 2,5mmol/l, Glu 7,5 mmol/l e Glu 20 mmol/l sono espressi come media \pm DS per gli esperimenti più rappresentativi ripetuti in triplicato per ogni concentrazione. $P < 0,005$ confrontando l'incremento del potenziale mitocondriale con Glu 7,5mmol/l e 20,0 mmol/l rispetto al basale di 2,5.

4.3.3 HUVEC:

Le cellule endoteliali estratte da cordone ombelicale sono cellule molto delicate che vanno facilmente in apoptosi se le condizioni del mezzo in cui sono coltivate non sono adeguate. Inizialmente ci siamo posti la domanda se la metodica di misurazione con il JC-1 fosse applicabile a questo tipo di cellule. In effetti, il 93% delle cellule presenti nel campione si è mantenuto vitale ed è stato possibile misurarne correttamente il $\Delta\Psi$ mitocondriale (fig 23).

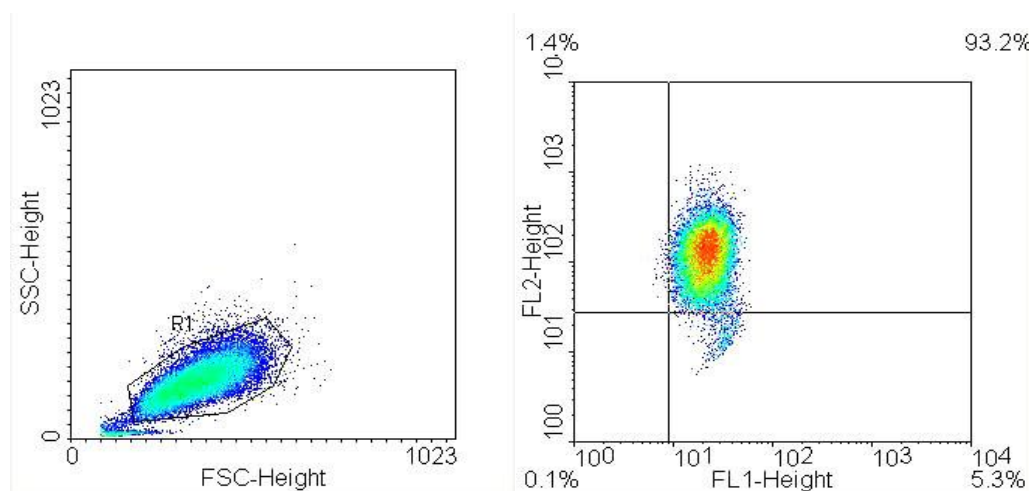


Fig 23: Huvec mantenute in PBS con il JC-1 a 37°C per 15 minuti. Nel Dot plot a sinistra viene fatto il gate delle cellule rilevate dal citofluorimetro. Su questo gate, nel dot plot di destra, viene rilevata la fluorescenza del 93,2% di cellule vitali.

5. DISCUSSIONE:

I neutrofili umani ricavano la maggior parte dell'energia dalla glicolisi [51]. Nei neutrofili, i mitocondri mantengono il potenziale trans-membrana che è normalmente associato con l'attività della catena respiratoria e la fosforilazione ossidativa dell'ADP. Come riportato in altri tipi di cellule, i neutrofili isolati mostrano una distribuzione irregolare di mitocondri iperpolarizzati e depolarizzati [52].

Il nostro studio è il primo ad aver esaminato il potenziale di membrana mitocondriale ($\Delta\Psi_m$) di leucociti circolanti in familiari di pazienti diabetici, e a documentare la presenza di iperpolarizzazione mitocondriale (MHP), maggiore nei pazienti con diabete di tipo 1 e intermedia nei parenti di primo grado.

Una disfunzione mitocondriale (iper- o de-polarizzazione) nei leucociti circolanti è stata osservata in patologie croniche autoimmuni come il Lupus sistemico eritematoso, e l'artrite reumatoide [53,54].

La MHP sottolinea la disfunzione mitocondriale, l'esaurimento di ATP, lo stress ossidativo e la abnorme attivazione e produzione di segnali di morte cellulare nei linfociti T del lupus [55]. Risultati recenti hanno dimostrato un elevato $\Delta\Psi_m$ e una massa mitocondriale minore nei pazienti con diabete di tipo 2 confrontati con controlli sani [56].

Questi studi, differiscono dal nostro, per alcuni aspetti importanti: (1) le cellule mononucleate sono state raccolte e separate con un procedimento che prevede l'uso del FYCOLLTM HYPaqueTM, un fluido denso e un gel di poliestere che funge da barriera per separare i due liquidi.

(2) La fluorescenza del JC-1 è stata misurata utilizzando una piastra a 96 pozzetti usando un lettore di piastra, e (3) nei pazienti diabetici e nei controlli sani è stata misurata solo la glicemia.

Al contrario noi (1) abbiamo usato sangue intero prelevato ai pazienti e sottoposto a minima manipolazione, (2) abbiamo misurato il potenziale di membrana mitocondriale usando un citofluorimetro, e (3) determinato indicatori a breve e lungo termine di controllo diabetico.

Oscillazioni spontanee nel flusso metabolico e nel $\Delta\Psi_m$ sono state correlate alla modulazione da parte dei ROS dell'attività dei canali anionici ROS-sensibili. Le oscillazioni mitocondriali dipendenti dai ROS possono contribuire all'eterogeneità del metabolismo energetico; lo stato redox del pool di glutatione (GSH) gioca un ruolo chiave nelle oscillazioni del $\Delta\Psi_m$.

In condizioni fisiologiche, questi “oscillatori” mitocondriali sono solo debolmente accoppiati da bassi livelli di ROS mitocondriali. In condizioni di stress metabolico, un aumento nella produzione di ROS può indurre un forte accoppiamento attraverso il rilascio di ROS mitocondriali e la riorganizzazione del network mitocondriale in un *cluster* sincronizzato, che si estende per l'intera cellula.

Questo meccanismo determina la risposta cellulare allo stress metabolico in senso positivo (iperpolarizzazione) o negativo (depolarizzazione) [57].

La citofluorimetria a flusso rivela la presenza di MHP nei polimorfonucleati circolanti dei membri di famiglie con pazienti diabetici, suggerendo una sincronizzazione funzionale del network mitocondriale, riscontrabile anche nei familiari che non hanno un diabete franco.

Precedentemente abbiamo osservato che gli indicatori di danno ossidativo erano incrementati nei parenti di primo grado di diabetici e che c'era una significativa correlazione tra i biomarkers dell'ossidazione e quelli dell'infiammazione [58].

Inoltre, i pazienti diabetici hanno ridotti livelli di GSH eritrocitario e tioli plasmatici, mentre lo stato redox dei tioli plasmatici sembra essere maggiormente perturbato nei parenti di primo grado. In questo studio, abbiamo osservato la presenza di MHP a livello dei leucociti e l'unica variabile correlabile con il $\Delta\Psi_m$ era la glicemia. Vari indici di sindrome metabolica sono stati precedentemente osservati in parenti di pazienti diabetici [58] e anche i fratelli esaminati in questo studio hanno mostrato una glicemia leggermente più alta rispetto ai controlli sani e livelli di HbA1c più bassi.

In una situazione di iperglicemia, a livello delle cellule endoteliali, la formazione di superossido viene associata con un aumento della metabolizzazione del glucosio nel ciclo di Krebs e ad un'iperpolarizzazione della membrana mitocondriale [59]. Nei neutrofili, sia mobili che aderenti, la concentrazione del NAD(P)H, il potenziale delle flavoproteine, la produzione di ROS e ossido nitrico, hanno tutti un andamento periodico, e mostrano una chiara relazione fra le fasi e le oscillazioni metaboliche; queste cellule mostrano un rapporto non lineare tra livello di substrato energetico e produzione di ROS e NO [60].

Contrariamente a quanto ci si aspettava, una stima approssimativa dell'attività dei ROS nei neutrofili a riposo, non mostrava nessuna differenza nei diversi gruppi considerando la fluorescenza generata dalla DHR. Inoltre, la produzione di ROS nei neutrofili stimolati con PMA non era significativamente più alta nei pazienti diabetici se confrontata con quella dei controlli sani, mentre era significativamente più bassa nei parenti.

Daoud et al. hanno recentemente investigato gli effetti di un'iperglicemia acuta in vitro su cellule immuni, opponendo questo stato a quello iperglicemico prolungato (in vivo) dei pazienti diabetici (sia di tipo 1, 5 soggetti, che di tipo 2, 5 soggetti) [61].

Essi hanno osservato una significativa inibizione nell'attività del metabolismo ossidativo nei polimorfo nucleati ottenuti da pazienti diabetici. Questi effetti non cambiano in seguito all'aggiunta di glucosio esogeno, in base al tipo di diabete considerato, alla durata della malattia e se i pazienti hanno o non hanno ricevuto trattamento con insulina.

Bilgic et al., che hanno studiato il profilo delle citochine sia nel diabete di tipo 1 che in quello di tipo 2 e la funzionalità dei neutrofili negli stadi precoci del diabete di tipo 1, hanno trovato che l'attività fagocitaria e ossidativa nei pazienti con diabete di tipo 1 non in trattamento insulinico è significativamente più bassa, se confrontata con quella di pazienti affetti da diabete da meno di tre mesi e con quella di soggetti sani. Essi hanno concluso che l'alterata attività dei neutrofili può essere

ripristinata dal trattamento insulinico [62]. La loro ipotesi può spiegare la normale attività ossidativa dei nostri pazienti diabetici.

Un'osservazione importante per questa discussione viene fornita da Thomson et al. i quali hanno indagato gli effetti dell'ipoglicemia indotta dall'insulina sul metabolismo ossidativo dei neutrofili in pazienti con diabete di tipo 1 e controlli sani: il burst ossidativo dei neutrofili di pazienti diabetici era simile a quello dei controlli sani, ma era significativamente ridotto in seguito a ipoglicemia; tale compromissione era significativamente maggiore nei controlli sani rispetto ai diabetici. Quindi, il burst ossidativo dei neutrofili è soppresso in risposta all'ipoglicemia, e questo fenomeno è più pronunciato nei soggetti non diabetici [63]. Questa osservazione potrebbe spiegare perché nel nostro studio i fratelli dei pazienti diabetici tipo 1, che avevano un indice MFI basale dei neutrofili trattati con DHR simile a quello dei controlli sani, avevano un indice MFI dopo stimolazione con PMA minore rispetto ai controlli. In conclusione, la minore glicemia post-prandiale (presumibile in base ai minori valori di HbA1c) dei parenti sani di soggetti diabetici potrebbe spiegare il ridotto burst ossidativo.

La ricerca su materiale umano è limitata dalla disponibilità di tessuti e dalla difficoltà di studiare lo stato non trattato di una malattia. Studiare i parenti di pazienti malati è un'utile strategia per identificare fenotipi intermedi in quanto i parenti condividono in media il 50% dei loro alleli.

Sulla base delle conoscenze attuali, noi possiamo speculare sul meccanismo in base al quale la MHP viene indotta e il burst ossidativo è inalterato o ridotto nei parenti di primo grado.

In quest'ottica, suggeriamo le seguenti evidenze che devono essere considerate. Primo, bassi livelli di ROS mitocondriali sono capaci di accoppiare oscillatori mitocondriali, mentre le sonde fluorescenti come la DHR forniscono solo una stima grossolana della produzione di ROS e non distinguono la produzione mitocondriale da quella citoplasmatica [64]. In secondo luogo, sebbene la respirazione mitocondriale e la sintesi di ATP dipendono dal potenziale mitocondriale, la correlazione tra il flusso e la fosforilazione ossidativa mitocondriale non è lineare nei mitocondri

isolati. Nella cellula in toto o nei tessuti perfusi, viene anche suggerita una generazione non-protonica del potenziale mitocondriale [65].

Terzo, anche se alcuni dati sperimentali suggeriscono che la produzione dei ROS dipende dal potenziale mitocondriale, lo studio dei fibroblasti umani in coltura suggerisce che la produzione di superossido non è strettamente dipendente dal potenziale mitocondriale [66].

Quarto, l'accoppiamento della catena di trasporto degli elettroni con la fosforilazione ossidativa è incompleto, e ciò è dovuto alla perdita di protoni (proton leak) attraverso la membrana mitocondriale interna. Ad oggi non conosciamo a quanto ammonti questa quota di proton leak (sia per trasporto passivo che per disaccoppiamento mediato da proteine) nei familiari di pazienti con diabete di tipo 1. La conduttanza protonica nei mitocondri muscolari dei ratti diabetici è ridotta se confrontata con quella dei controlli non diabetici; la ragione di questo migliore accoppiamento senza alterazione nella produzione di ATP è sconosciuta [65].

Quinto, sebbene i mitocondri e la famiglia delle NADPH ossidasi siano le fonti principali di attivazione dei ROS da parte di stimoli esterni, vi sono poche informazioni riguardo alla loro correlazione funzionale [67].

Infine, tipi diversi di cellule rispondono diversamente allo stesso stimolo: le cellule mesangiali esposte ad alte concentrazioni di glucosio generano ROS principalmente attraverso l'attivazione della NADPH ossidasi, mentre le cellule endoteliali esposte ad alte concentrazioni di glucosio, generano ROS attraverso un meccanismo che coinvolge i mitocondri [68].

Per quanto riguarda la stimolazione in vitro dei neutrofili circolanti con glucosio, siamo partiti dall'ipotesi che, nei pazienti diabetici, alcuni aspetti della funzionalità immunitaria sarebbero alterati. In generale, il sistema immune non è solo alterato dall'iperglicemia, ma anche dallo stato di acidosi o chetosi che può verificarsi in questi pazienti. E' generalmente accettato che sia presente una riduzione nel numero dei linfociti T-helper, nell'attività citotossica delle cellule NK e nelle reazioni

immunitarie a risposta tardiva [69-70]. Sebbene siano riportate carenze transitorie nella produzione di IgG nel diabete di tipo 1, l'immunità umorale resterebbe intatta.

Anche la funzionalità del complemento è alterata dall'iperglicemia, specialmente per quanto riguarda la componente C3; questo si riflette sia sul riconoscimento del host, sia sulla risposta alle infezioni microbiche [71].

Molti aspetti funzionali dei polimorfonucleati sono alterati dall'iperglicemia: chemiotassi, fagocitosi, attività battericida e produzione di antiossidanti ma, la maggior parte di questi effetti è indipendente dal tipo di diabete, dalla durata della malattia, dall'età dei pazienti e/o dai livelli di HbA1c e qui si ritorna alla citazione degli studi di Dadou et al.

Il fatto che in vitro l'iperglicemia non alteri significativamente il potenziale di membrana mitocondriale dei neutrofili circolanti ci fa capire che lo studio di queste cellule, in una situazione di iperglicemia, richiede tempi molto più lunghi di esposizione. Dobbiamo tenere presente tutta una serie di fattori cellulari e umorali, oltre allo stato iperglicemico, che vanno a influenzare, in un paziente diabetico, lo sviluppo e la formazione delle cellule del sistema immunitario, a partire da quelle staminali nel midollo emopoietico, per giungere alle cellule mature e differenziate presenti a livello plasmatico e tissutale.

In conclusione, l'esposizione a uno stato iperglicemico acuto, in vitro, può essere un inizio, ma da solo non può bastare a riprodurre la moltitudine di fattori e processi coinvolti in una patologia così complessa come il diabete, con un sistema immunitario così multiforme e sensibile a numerosi stimoli, come quello umano. D'altra parte, come dimostrato da Beitland et al [72], i risultati che si ottengono studiando i polimorfonucleati in vitro differiscono da quelli riscontrati in vivo a causa di numerosi fattori (interazioni cellulari, meccanismi regolatori ormonali come quelli rilasciati dall'asse ipotalamo-ipofisario e il contributo di numerosi organi come fegato, pancreas, tessuto adiposo) che non sono riproducibili in vitro.

Per cercare di comprendere più a fondo le cause e le alterazioni alla base di una patologia così vasta e così complessa come il diabete abbiamo pensato di estendere la nostra ricerca anche alle colture cellulari, scegliendo tipi cellulari diversi che, in base alla letteratura attualmente disponibile, sono tutte coinvolte nella eziopatogenesi del diabete e delle sue complicanze e rappresentano modelli sperimentali in grado di aiutarci a comprendere meglio le perturbazioni molecolari coinvolte in questa patologia. La sfida è stata grande, perché le cellule aderenti hanno problematiche ed esigenze diverse rispetto alle cellule circolanti nel sangue.

Per settare la metodica su cellule aderenti che crescono in monostrato abbiamo scelto i fibroblasti umani ricavati dalla cute. La scelta è ricaduta su queste cellule perché, in primo luogo, sono cellule facilmente reperibili, non hanno grandi esigenze e si prestano bene ad essere manipolate in quanto sono molto resistenti. In secondo luogo, perché sono cellule principalmente coinvolte nella riparazione dei tessuti e, come riportato da Oren et al, nei ratti diabetici queste cellule mostrano alterazioni che non si ritrovano nei fibroblasti di ratti sani. In particolare, i fibroblasti di ratti diabetici e resi deficienti per il recettore della leptina, mostrano una riduzione della migrazione, e non vengono significativamente stimolati dall'ipossia come i fibroblasti dei controlli sani. I fibroblasti diabetici producono il doppio di metallo proteinasi-9 rispetto ai controlli sani e hanno livelli di VEGF sette volte inferiori, che sarebbero alla base della lenta e alterata chiusura delle ferite nei soggetti diabetici e sarebbero dovute, in massima parte, alla prolungata esposizione dei fibroblasti all'iperglicemia [73].

La metodica è stata messa a punto basandoci sul lavoro di Dogliotti G. et al, che hanno misurato il potenziale di membrana mitocondriale nei fibroblasti di pazienti affetti da Sindrome di Down ed esposti ad un agente tossico come l'acido okadaico, utilizzando come sonda fluorescente per la misura del $\Delta\Psi_m$ proprio il JC-1 [74].

Il problema fondamentale dei fibroblasti nella lettura con il citofluorimetro è dovuta fondamentalmente alla loro grande adesività che ci può dare dei dati alterati per quanto riguarda

l'intensità di fluorescenza. Abbiamo aggirato questo ostacolo andando a mettere in relazione l'altezza relativa del picco che si ottiene in seguito all'emissione di fluorescenza (vedi fig.17), con l'area sottesa dal picco stesso. Questo tipo di analisi ci ha permesso di identificare la regione del dot plot corrispondente ai soli singoletti (escludendo doppietti, triplette ecc) in modo di avere i dati reali corrispondenti alle singole cellule.

Anche nel caso dei fibroblasti, l'esposizione a un'iperglicemia acuta (max fino a 24 ore) non induce alterazioni significative nel $\Delta\Psi_m$ di queste cellule. Anche in questo caso, si ipotizza l'intervento in vivo di ulteriori fattori e condizioni e quindi un quadro più complesso e prolungato nel tempo che potrebbe portare all'alterazione funzionale di queste cellule.

Le cellule beta del pancreas secernono insulina in risposta a molecole che fungono da “carburanti metabolici”, come il glucosio. Il glucosio viene metabolizzato per generare ATP; l'aumento del rapporto ATP/ADP inibisce i canali del potassio ATP-sensibili e questo causa una depolarizzazione della membrana plasmatica, l'entrata di calcio nelle cellule attraverso canali voltaggio-sensibili, e l'esocitosi dell'insulina contenuta nei granuli. La secrezione di insulina in risposta al glucosio (la cosiddetta GSIS, (glucose-stimulated insulin secretion) supera la quota di insulina rilasciata in condizioni basali.[75].

Un modello promettente per lo studio delle alterazioni indotte da glucosio sono le cellule INS-1E; queste cellule contengono numerosi granuli di insulina ed esibiscono la GSIS. Vi sono pochi studi che riguardano la produzione di insulina da parte delle INS-1E, che invece rappresentano un modello ideale per lo studio di parametri bioenergetici durante la GSIS [76].

Sappiamo che la GSIS è alterata nelle INS-1E che sono coltivate a basse concentrazioni di glucosio e che il metabolismo del glucosio e la secrezione autocrina di insulina sono entrambi richiesti nelle INS-1E in coltura. Nel nostro studio, le cellule mantenute in terreno a bassa concentrazione di glucosio e poi stimulate con glucosio stesso mostrano un'iperpolarizzazione del $\Delta\Psi_m$. Infatti, nelle cellule mantenute a bassa concentrazione di glucosio, la fosforilazione ossidativa rimane in uno stato

di attivazione molto basso dove la perdita di substrati energetici non permette di generare un grande potenziale di membrana mitocondriale. L'aggiunta di glucosio ripristina il $\Delta\Psi_m$ e attiva la macchina della fosforilazione ossidativa che permette la sintesi di ATP e l'innalzamento dei valori di $\Delta\Psi_m$ al di sopra di quelli osservati in assenza di substrato.

Il fatto che la massima iperpolarizzazione si abbia con valori di glucosio intermedi e che ulteriori aggiunte di questo substrato non determinino un ulteriore incremento significativo del $\Delta\Psi_m$ è spiegabile, in accordo con Antiozzi et al, attraverso la comprensione dei parametri termodinamici della generazione del gradiente di protoni attraverso la membrana mitocondriale interna. Il NADH e $FADH_2$ donano elettroni alla catena di trasporto degli elettroni stessi, la quale a sua volta fornisce l'energia per pompare protoni attraverso la membrana mitocondriale interna verso i complessi I, III e IV per creare il gradiente. L'energia richiesta per pompare un protone attraverso questo gradiente aumenta all'aumentare della differenza di pH tra i due compartimenti. Questa richiesta di energia è ulteriormente incrementata perché la superficie interna della membrana mitocondriale interna diventa più negativa rispetto alla superficie esterna e ciascun protone viene pompato fuori dalla matrice. Questi due fattori determinano l'energia richiesta per la generazione del gradiente di protoni. Il massimo gradiente protonico può essere raggiunto quando l'energia richiesta per pompare fuori protoni supera l'energia prodotta dal potenziale riducente di NADH E $FADH_2$ e la pompa protonica cessa di funzionare. La limitazione nella formazione del gradiente protonico limita la produzione di ATP a livello mitocondriale. Fattori che inibiscono la catena di trasporto degli elettroni e la formazione di ATP oppure che dissipano il gradiente protonico alterano anche la secrezione insulinica e, di conseguenza, anche il $\Delta\Psi_m$ essendo questi due parametri strettamente correlati.

Per quanto riguarda le HUVEC, invece, possiamo per ora solo affermare che le cellule rimangono vive in una percentuale elevata e al di là di ogni nostra più rosea aspettativa; come mostrato in figura 21, infatti, è possibile leggere la fluorescenza di oltre il 93% delle cellule esaminate.

L'uso delle HUVEC è stato motivato dal fatto che le patologie a carico della macro e micro-vascolatura sono la principale causa di mortalità e morbidità nei pazienti affetti da diabete. Nello studio di Yasudo et al, infatti, viene dimostrato come le HUVEC siano particolarmente sensibili all'iperglicemia e come questa condizione ne aumenti significativamente l'apoptosi [77].

L'uso delle HUVEC appare anche molto importante in quanto studi recenti provano che le cellule dei vasi e di vari organi bersaglio mantengano una sorta di “memoria metabolica” dell'iperglicemia, che favorirebbe l'insorgere delle complicanze tipiche del diabete.

6. CONCLUSIONI:

6.1. Misurazione del $\Delta\Psi_m$ e del burst ossidativo su cellule circolanti ex vivo da pazienti diabetici, loro fratelli e controlli sani:

- Nei parenti dei pazienti diabetici le oscillazioni del potenziale mitocondriale indotte dai ROS sembrano essere sincronizzate verso uno stato di iperpolarizzazione
- L'associazione positiva fra il potenziale mitocondriale e la glicemia, in un range che va dallo stato normo-glicemico a quello dis-glicemico, suggerisce che l'iperglicemia aumenti la metabolizzazione del glucosio e favorisca così la formazione di ossidanti e l'iperpolarizzazione della membrana mitocondriale.
- La fluorescenza leucocitaria basale della sonda DHR, ha dato risultati simili nei tre gruppi studiati. Al contrario, il burst ossidativo nelle cellule isolate dai fratelli non diabetici in risposta all'agente stimolante PMA, era più basso rispetto ai controlli sani. Questo dato potrebbe essere strettamente correlato con la minore glicemia post-prandiale (presumibile in base ai minori valori di HbA1c) dei parenti sani di soggetti diabetici.
- L'indagine di parametri come il potenziale di membrana mitocondriale e l'attività del burst ossidativo attraverso l'uso della citofluorimetria a flusso su sangue intero rappresenta un metodo rapido per fornire indicazioni importanti sui meccanismi alla base di numerosi processi patologici.

6.2 Misurazione del $\Delta\Psi_m$ in neutrofili umani incubati in vitro:

I neutrofili circolanti si sono rivelati cellule poco adatte per la valutazione di variazioni nel potenziale mitocondriale indotte da concentrazioni diverse di glucosio e/o insulina in incubazioni a breve o lungo termine. Infatti, dosi anche elevate di glucosio e/o insulina aggiunte al sangue intero non hanno alterato in maniera significativa il $\Delta\Psi_m$ mitocondriale dei neutrofili dopo incubazioni da 15 minuti fino a 24 ore. Anzi, nelle incubazioni prolungate fino a 24 ore del campione di sangue

intero, abbiamo assistito alla progressiva depolarizzazione mitocondriale. Il divario nei valori di potenziale mitocondriale tra neutrofili di pazienti diabetici e cellule sottoposte a brevi eventi di iperglicemia acuta ci fa pensare che il fenomeno vada considerato in un'ottica più vasta, che include anche altre variabili e tempi di incubazione più lunghi. In vivo intervengono interazioni ormonali e cellulari che non sono riproducibili in vitro ma che in vivo incidono tanto sui parametri bioenergetici cellulari.

6.3. Misurazione del $\Delta\Psi_m$ su culture cellulari:

- La misurazione del potenziale mitocondriale con il citofluorimetro è possibile anche nelle cellule aderenti coltivate in monostrato.
- Perfino con cellule che presentano caratteristiche di grande adesività come i fibroblasti, è possibile isolare gli eventi che ci interessano grazie alla grande versatilità e alle potenzialità di uno strumento come il citofluorimetro.
- Come riscontrato per i neutrofili, anche i fibroblasti non mostrano alterazioni significative del $\Delta\Psi_m$ in seguito all'incubazione prolungata con concentrazioni diverse di glucosio. Anche in questo caso, quindi, concludiamo che il divario nei valori di $\Delta\Psi_m$ di fibroblasti diabetici e fibroblasti incubati con glucosio è da ricondurre agli innumerevoli fattori umorali e cellulari che, insieme ad uno stato di iperglicemia in vivo, influenzano la storia biomolecolare di una cellula, dalla sua nascita alla sua morte.
- L'iperpolarizzazione delle INS-1E che si ottiene mantenendo le cellule in una condizione di ipoglicemia e, successivamente, stimolando queste cellule con glucosio, è una chiara prova del fenomeno della GSIS, ovvero della secrezione autocrina di insulina che si ha in seguito alla stimolazione da parte del glucosio. Questo prova anche che le INS-1E sono cellule che si comportano in maniera molto simile alle cellule beta delle isole del Langerhans e che, quindi,

rappresentano un modello sperimentale eccellente per lo studio dei fenomeni legati alla disfunzione beta-cellulare.

-Il fatto che anche cellule estremamente delicate come le HUVEC possano essere studiate con questa metodica ci fa ben sperare di poter proseguire i nostri studi sulla “memoria metabolica” cellulare.

7. SVILUPPI FUTURI:

Intendiamo focalizzare la ricerca futura sull'isolamento di cellule endoteliali HUVEC e sull'analisi delle variazioni di $\Delta\Psi_m$ in differenti condizioni d'incubazione con lo scopo di ottenere informazioni sui meccanismi che permettono l'instaurazione del fenomeno della memoria metabolica.

8. BIBLIOGRAFIA:

- 1 Kaneto H, Kawamori D, Matsuoka T et al. Oxidative stress and pancreatic beta-cell dysfunction. *Am J Ther* 2005; 12:529-33
- 2 Lowell BB, Shulman GI. Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science* 2005;307:3847.
- 3 Kaneto H, Nakatani Y, Kawamori D, et al. Role of oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, and c-Jun N-terminal kinase in pancreatic beta-cell dysfunction and insulin resistance. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38:782-93
- 4 Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 2000;404:787-90
- 5 Maiese K, Chong ZZ, Shang YC. Mechanistic insights into diabetes mellitus and oxidative stress. *Curr Med Chem* 2007; 14:1729-38
- 6 Stevens MJ. Oxidative-nitrosative stress as a contributing factor to cardiovascular disease in subjects with diabetes. *Curr Vasc Pharmacol* 2005; 3:253-66
- 7 Wei Y, Sowers JR, Nistala R, et al. Angiotensin II-induced NADPH oxidase activation impairs insulin signaling in skeletal muscle cells. *J Biol Chem.* 2006; 281:35137-46
- 8 Alessandro Corti, Vincenzo De Tata, Alfonso Pompella. Agenti e meccanismi di stress ossidativo nella patologia umana. *LigandAssay* 14 (1) 2009
- 9 MacNee W. Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. *Eur J Pharmacol* 2001; 429:195-207
- 10 Rahman I, Adcock IM. Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD. *Eur Respir J* 2006; 28:219-42

- 11 Basu S, Whiteman M, Matthey DL, Halliwell B. Raised levels of F(2)-isoprostanes and prostaglandin F(2alpha) in different rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* 2001;60:627-31
- 12 Griffiths HR. ROS as signalling molecules in T cells –evidence for abnormal redox signalling in the autoimmune disease, rheumatoid arthritis. *Redox Rep* 2005;10:273-80
- 13 Boekema, E.J; Braun, H.P. Supramolecular structure of the mitochondrial oxidative phosphorylation system. *J.Biol.Chem.*,2007, 282,1
- 14 Brand M.D and Nicholls D. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem.J.* (2011) 435, 297-312
- 15 Adam-Vizi, V; Chinopoulus, C. Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends.Pharmacol.Sci.*, 2006, 27, 639
- 16 Tretter, L; Adam-Vizi, V. Alpha-ketoglutarate dehydrogenase: a target and generator of oxidative stress. *Phil.Trans.R.Soc.B*,2005, 360, 2335
- 17 Coatrieux, C; Sanson, M; Negre-Salvayre, R; Parini, A; Hannun, Y; Itohara, S; Salvayre, R; Auge, N. MAO-A-induced mitogenic signaling is mediated by reactive oxygen species, MMP-2, and the sphingolipid pathway. *Free Radic.Biol.Med*, 2007, 43,80
- 18 Leninger A.L. The Mitochondrion. *W.A. Benjamin, Inc.*, New York.1965
- 19 Kroemer G., Reed J.C. Mitochondrial control of cell death. *Nat. Med.* 6, 513.
- 20 Sivitz W.I and Yorek M.A. Mitochondrial dysfunction in diabetes: from molecular mechanism to functional significance and therapeutic opportunities. *Antiox. Redox.Signal.* 2010. February 15; 12(4): 537-577.
- 21 Kerr J.F.R, Harmon B.V. definition and incidence of apoptosis: an historical prospective. In: *Apoptosis: the molecular basis of cell death*, Tomei L.D. and Cope F.O. Eds, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1991, 5-29.
- 22 Cohen J.J., Duke R.C. Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 1992, 10, 267-293.
- 23 Williams, R. W., & Herrup, K. (1988). The control of neuron number. *Annu Rev Neurosci*, 11, 423-453.

- 24 Naruse, I., & Keino, H. (1995). Apoptosis in the developing CNS. *Prog Neurobiol*, 47(2), 135-155.
- 25 Wyllie A.H., Kerr J.F.R., Currie A.R. Cell death: the significance of apoptosis. *Int.Rev. Cytol.* 1980, 68, 251-306.
- 26 Wyllie A.H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*. 1980, 286, 555-556.
- 27 Cohen J.J., Duke R.C. Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 1992, 10, 267-293.
- 28 Banda, N. K., Bernier, J., Kurahara, D. K., Kurre, R., Haigwood, N., Sekaly, R. P., & Finkel, T. H. (1992). Crosslinking CD4 by human immunodeficiency virus gp120 primes T cells for activation-induced apoptosis. *J Exp Med*, 176(4), 1099-1106.
- 29 Raff, M. C., Barres, B. A., Burne, J. F., Coles, H. S., Ishizaki, Y., & Jacobson, M. D. (1993). Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science*, 262(5134), 695-700.
- 30 Wrigth S.C., Zhong J., Larrick J.W. Inhibition of apoptosis as a mechanism of tumor promotion. *FASEB J.* 1994, 8, 654-660.
- 31 Chervonsky, A. V. (1999). Apoptotic and effector pathways in autoimmunity. *Curr Opin Immunol*, 11(6), 684-688.
- 32 Duvall E., Wyllie A.H., Morris R.G. Macrophage recognition of cells undergoing programmed cell-death (apoptosis). *Immunology*. 1985,56,351-358.
- 33 Savill, J., Fadok, V., Henson, P., & Haslett, C. (1993). Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol Today*, 14(3), 131-136.
- 34 Giovanetti A., Pierdominici M., Di Iorio A., Cianci R., Murdaca G., Puppo R., Pandolci F., Paganelli R. Apoptosis in the homeostasis of the immune system and in human immune mediated diseases. *Curr.Pharm.Des.*, 2008, 14, 253-268.
- 35 Leninger A.L. The Mitochondrion. W.A. Benjamin, Inc., New York. 1965
- 36 Raam B.J., Sluiter W., De Wit E., Roos D., Verhoeven A.J., Kuijpers T.W. Mitochondrial Membrane Potential in Human Neutrophils is maintained by Complex III Activity in the absence of Supercomplex Organisation. *Plos ONE*, Apr 23; 3 (4): e2013, 2008.

- 37 Ceriello A.; Esposito K.; Ihnat M.; Thorpe J.; Giugliano D. Long-Term Glycemic Control influences the long- lasting effect of hyperglycemia on Endothelial Function in Type 1 Diabetes. *J.Clin. Endocrinol. Metab.* Jun 2, 94: 2751-2756, 2009.
- 38 Esper RJ., Nordaby RA., Vilarino JO., Paragano A., Cacharron JL., Machado RA. Endothelial Disfunction: a comprehensive appraisal. *Cardiovasc. Diabetol*, 5: 4, 2006.
- 39 Ceriello A. New Insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to a “casual” antioxidant therapy. *Diabetes Care*, 26: 1589-1596, 2003.
- 40 Ceriello A., Michael A., Ihnat MA, Thorpe JE. The”Metabolic Memory”: Is more than just tight glucose control necessary to prevent Diabetic complications?. *J.Clin. Endocrinol. Metab.* Dec 9, 94: 410-415, 2008.
- 41 Ihnat MA, Thorpe JE, Kamat CD, Szabó C, Green DE, Warnke LA, Lacza Z, Cselenyák A, Ross K, Shakir S, Piconi L, Kaltreider RC, Ceriello A. Reactive oxygen species mediate a cellular 'memory' of high glucose stress signalling. *Diabetologia*. 2007 Jul;50(7):1523-31. Epub 2007 May 17.
- 42 Cossarizza A., Baccarani-Contri M., Kalashnikova G., Franceschi C. A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 197, 40. 1993.
- 43 Matteucci E., Giampietro O. Flow Cytometry study of leukocyte function: Analytical Comparison of methods and their applicabilità to clinical research. *Current Medicinal Chemistry*. Dec., 25.15, 6. 2007.
- 44 Perry S.W., , Norman J.P., Barbieri J., Brown E.B., and Gelbard H.A. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *Biotechniques*. February ; 50(2): 98–115. doi:10.2144/000113610.
- 45 Bai.G., Rao R., Murthy Ch.R.K., Panickar .K.S., Jayakumar.A.R., Norenberg. M.D. Ammonia induces the M itochondrial Permeability Transition in Primary Culture of rat Astrocytes. *J.Neurosc.Res.* 66:981-991. 2001
- 46 S. J. Vowellsa, S. Sekhsariab, H. L. Malecha, M. Shalita and T. A. Fleisherb. Flow cytometric analysis of the granulocyte respiratory burst: a comparison study of fluorescent probes. *Journal of Immunological Methods* .Volume 178, 1, 89-97, 1995.

- 47 Bonora E, Targher G, Alberiche M, Bonadonna RC, Saggiani F, Zenere MB, Monauni T, Muggeo M: Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity. *Diabetes Care* 23:57–63, 2000.
- 48 Lerman O.Z., Galiano. R.B., Armour. M., Levine. J.P., Gurtner.G.C. Impairment in migration, vascular endothelial growth factor production and response to hypoxia. *Am.J.pathol.* Vol.62, 1.303-312. Jan. 2003.
- 49 Merglen A., Theander s., Rubi B., Chaffard G., Claes B., Wollheim C.B., Maechler P. Glucose sensitivity and metabolism-secretion coupling studied during two-year continuous culture in INS-1E Insulinoma Cells. *Endocrinol.* 145(2):667-678. Feb.2004.
- 50 Jaffe E.A, Nachman R.L, Becker C.G, Minick C.R: Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 1973;52:2745-56.
- 51 Borregaard, N., Herlin, T. (1982). Energy metabolism of human neutrophils during phagocytosis. *J Clin Invest*, 70, 550-557.
- 52 Fossati, G., Moulding, D.A., Spiller, D.G., Moots, R.J., White, M.R., Edwards, S.W. (2003). The mitochondrial network of human neutrophils: role in chemotaxis, phagocytosis, respiratory burst activation, and commitment to apoptosis. *J Immunol*, 170, 1964-1972.
- 53 Moodley, D., Mody, G., Patel, N., Chuturgoon, A.A. (2008). Mitochondrial depolarisation and oxidative stress in rheumatoid arthritis patients. *Clin Biochem*, 41, 1396-1401.
- 54 Fernandez, D., Perl, A. (2009). Metabolic control of T cell activation and death in SLE. *Autoimmun Rev*, 8, 184-189.
- 55 Perl, A. (2010). Systems biology of lupus: mapping the impact of genomic and environmental factors on gene expression signatures, cellular signaling, metabolic pathways, hormonal and cytokine imbalance, and selecting targets for treatment. *Autoimmunity*, 43, 32-47.
- 56 Widlansky, M.E., Wang, J., Shenouda, S.M., Hagen, T.M., Smith, A.R., Kizhakekuttu, T.J., et al. (2010). Altered mitochondrial membrane potential, mass, and morphology in the mononuclear cells of humans with type 2 diabetes. *Transl Res*, 156, 15-25.
- 57 Slodzinski, M.K., Aon, M.A., O'Rourke, B. (2008). Glutathione oxidation as a trigger of mitochondrial depolarization and oscillations in intact hearts. *J Mol Cell Cardiol*, 45, 650-660.

- 58 Matteucci, E., Giampietro, O. (2007). Building a bridge between clinical and basic research: the phenotypic elements of familiar predisposition to type 1 diabetes. *Curr Med Chem*, 14, 555-567.
- 59 Quijano, C., Castro, L., Peluffo, G., Valez, V., Radi, R. (2007). Enhanced mitochondrial superoxide in hyperglycemic endothelial cells: direct measurements and formation of hydrogen peroxide and peroxynitrite. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 293, H3404-3414.
- 60 Rosenspire, A.J., Kindzelskii, A.L., Simon, B.J., Petty, H.R. (2005). Real-time control of neutrophil metabolism by very weak ultra-low frequency pulsed magnetic fields. *Biophys J*, 88, 3334-3347.
- 61 Daoud, A.K., Tayyar, M.A., Fouda, I.M., Harfeil, N.A. (2009). Effects of diabetes mellitus vs. *in vitro* hyperglycemia on select immune cell functions. *J Immunotoxicol*, 6, 36-41.
- 62 Bilgic, S., Aktas, E., Salman, F., Ersahin, G., Erten, G., Yilmaz, M.T., et al. (2008). Intracytoplasmic cytokine levels and neutrophil functions in early clinical stage of type 1 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*, 79, 31-36.
- 63 Thomson, G.A., Fisher, B.M., Gemmell, C.G., MacCuish, A.C., Gallacher, S.J. (1997). Attenuated neutrophil respiratory burst following acute hypoglycaemia in diabetic patients and normal subjects. *Acta Diabetol*, 34, 253, 253-256.
- 64 Sivitz, W.I., Yorek, M.A. (2010). Mitochondrial dysfunction in diabetes: from molecular mechanisms to functional significance and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*, 12, 537-577.
- 65 Benard, G., Rossignol, R. (2008). Ultrastructure of the mitochondrion and its bearing on function and bioenergetics. *Antioxid Redox Signal*, 10, 1313-1342.
- 66 Koopman, W.J., Nijtmans, L.G., Dieteren, C.E., Roestenberg, P., Valsecchi, F., Smeitink, J.A., et al. (2010). Mammalian mitochondrial complex I: Biogenesis, Regulation and Reactive Oxygen Species generation. *Antioxid Redox Signal*, 12, 1431-1470.
- 67 Lee SB, Bae IH, Bae YS, Um HD. (2006). Link between mitochondria and NADPH oxidase 1 isozyme for the sustained production of reactive oxygen species and cell death. *J Biol Chem*, 281, 36228-36235.
- 68 Xia, L., Wang, H., Goldberg, H.J., Munk, S., Fantus, I.G., Whiteside, C.I. (2006). Mesangial cell NADPH oxidase upregulation in high glucose is protein kinase C dependent and required for collagen IV expression. *Am J Physiol Renal Physiol*, 290, F345-356.
- 69 Jones, R.L., and Peterson, C.M. Hematologic alterations in diabetes mellitus. *Am.J.Med.*70:339-352.1981.

- 70 Fontana , G., Lapolla. A., Sanzari.M., Piva. E., Mussap.M., De Toni. S., Plebani.M., Fusetti. F., and Fedele.D. An immunological evaluation of type II diabetic patients with periodontal diseases. *J Diabetes Compl.* 13:23-30.1999
- 71 Vergani.D., Johnson. C., Abdullah. N., and Barnett. A.H. Low serum C4 concentration: An inherited predisposition to insulin dependent diabetes? *Br.Med.J.* 286:926-928. 1983.
- 72 Beitland S., Opdahl H., Aspelin T., Saetre L., and Lyeberg T. Blood leucocyte cytokine production after LPS stimulation at different concentrations of glucose and/or insulin. *Acta Anaesthesiol Scand.* 53:183-189. 2009.
- 73 Oren.Z., Lerman. O.Z., Robert. D., Galiano.M.A., Jamie.P.L., and Gurtner.G.C. Impairment in migration, vascular endothelial growth factor production, and response to hypoxia. *Am.J.Path.*162,1.303-312. 2003.
- 74 Dogliotti.G., Galliera.E., Dozio.E., Vianello.E., Villa.R.E., Licastro.F., Barajon.I., Corsi.M.M. Okadaic acid induces apoptosis in Down syndrome fibroblast. *Toxicol.in vitro.* 24(2010), 815-821.
- 75 Spacek.T., santorova. J., Zacharovova.K., Berkova.Z., Hlavata.L., Saudek.F., Jezek.P. Glucose-stimulated insulin secretion of insulinoma INS-1E cells is associated with elevation of both respiration and mitochondrial membrane potential. *Int.J.Biochem.Cell biol.*40, 1522-1535.2008.
- 76 Antinozzi. P.A., Ishihar. H., Newgard. C.B., and Wollheim.C.B. Mitochondrial metabolism sets the maximal limit of fuel-stimulated insulin secretion in a model pancreatic beta cell. *J.Biol.Chem.* 277, 11746-11755. 2002.
- 77 Yasuo. I., Carling. D., and Ruderman.N. Hyperglycemia-Induced Apoptosis in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. Inhibition by the AMP-Activated Protein Kinase Activation. *Diabetes*, 51, 159-167.2002.

Ringraziamenti:

Ringrazio infinitamente la Dott.ssa Elena Matteucci e il Prof. Ottavio Giampietro.

Ringrazio il Prof. Franco Mosca, la Prof.ssa Biancamaria Longoni, il Dott. Vincenzo De Tata, il Dott. Antonelli e il Dott. Simoncini.

Ringrazio mio marito, il Dott. Mauro Cecere, che mi ha sempre incoraggiato e motivato a portare avanti questo lavoro, e i miei figli Nicola e Gabriele, per il semplice fatto di esistere.